

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**ESTRATEGIAS DE MULTIMERIZACIÓN PARA LA GENERACIÓN  
DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES CON UTILIDAD  
DIAGNÓSTICA Y TERAPÉUTICA**

**ÁNGEL CUESTA MARTÍNEZ**

**MADRID, 2009**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**ESTRATEGIAS DE MULTIMERIZACIÓN PARA LA GENERACIÓN  
DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES CON UTILIDAD  
DIAGNÓSTICA Y TERAPÉUTICA**

**ÁNGEL CUESTA MARTÍNEZ  
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIRECTOR: Dr. LUIS ÁLVAREZ-VALLINA**

**HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO**

El Dr. LUIS ÁLVAREZ VALLINA, Jefe Adjunto del Servicio de Inmunología y Jefe de la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid.

CERTIFICA

Que el trabajo titulado *Estrategias de Multimerización para la Generación de Anticuerpos Recombinantes con utilidad Diagnóstica y Terapéutica*, que presenta ÁNGEL CUESTA MARTÍNEZ para la obtención del GRADO DE DOCTOR por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo mi dirección en la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid y reúne las condiciones de calidad, contenido y formales exigibles para ser presentado ante el tribunal correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Madrid a 30 de abril de 2009.

Dr. Alberto Muñoz Terol  
Profesor Honorario  
Departamento de Bioquímica  
Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Luis Álvarez Vallina  
Director de Tesis

Esta Tesis Doctoral, realizada en la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro, ha sido financiada por el Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 02/1144) y el Ministerio Ciencia y Tecnología (BIO2001-0235 y BIO2005-04794).

Ángel Cuesta Martínez ha disfrutado de una beca de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro (2006) dentro del programa de Formación de Personal Investigador

## AGRADECIMIENTOS

Agradecer (De *gradecer*):

1. tr. Sentir gratitud.
2. tr. Mostrar gratitud o dar gracias.
3. tr. Dicho de una cosa: Corresponder al trabajo empleado en conservarla o mejorarla.

Gratitud (De *gratitūdo*):

1. f. Sentimiento que nos obliga a estimar el beneficio o favor que se nos ha hecho o ha querido hacer, y a corresponder a él de alguna manera.

Real Academia Española de la Lengua

Queridos lectores, la parte más visitada de la Tesis tiene una principal finalidad: que me sirva para que no os olvide nunca. Como era muy obvio deciros “Prometo estarte agradecido”, del hijo de dios en la tierra Rosendo Mercado; os digo otra de sus no menos célebres frases: “Se os quiere y ustedes lo sabéis”.

No puedo dejar de citar a Charles R. Darwin en este año. Su revolución científica, con sus consecuencias políticas y sociales, le hacen ser una de las personas más importantes y es fundamental saber de sus ideas para entender los últimos tiempos/siglos. Probablemente ésta Tesis no sería posible sin su aportación. Gracias a él y a científicos como él, que abrieron los ojos, miraron, entendieron y despertaron a los demás.

Este largo camino de carrera y Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin el apoyo, la comprensión, ayuda y sacrificio, desde el primer día y hasta el último, de Ángel y Toñi. No hay nada en el mundo que se aproxime lo suficiente a lo que se merecen por todo lo que han hecho por sus hijos. Por ello esta Tesis es mi homenaje, está dedicada por completo a vuestro enorme esfuerzo y dedicación.

Pedromi, Juanan, María, Gema, Nuria, Pablo, Miguel, Ainhoa y los recientes Iván y David, sois parte de mi vida, que, sin saber muy bien qué es eso de una Tesis, habéis preguntado por mis celulillas, ratones y experimentos como si fueran mis hijos. Perdonad por no veros lo suficiente y el mal humor, intentaré recuperar el tiempo perdido. Iván y David, vosotros me hacéis ser mejor persona y por vosotros intento hacer este mundo algo más agradable.

En la columna del “les debes mucho” está el resto de familia tanto la de Madrid como la de Zazuar y la “política”, especialmente a Chon, Marcelino, Carmen, “Señor Martínez”, Elena, Tomás, Loli, Andrés, Celinda, Puri y “Los Paquitos”. Mención *cum laude* para Luis y Francis; un día se coló un Biólogo en vuestra casa y lo recibisteis como a un hijo, gracias a vuestro apoyo, sabiduría y comprensión me habéis hecho crecer como persona.

Código Civil aparte, tengo más familias:

- la familia del barrio: Mario (este tío va a dar mucho que hablar, aviso), Raquel, Gloria, Fernando, Óscar, Mónica, Elena, Juan Carlos, “Turco” Candiotti y los “sobrinos” que van llegando. Qué sería de mi hígado y de mi juventud sin todos vosotros, gracias por hacerme vivir historias para contar a los nietos y gracias por soportarme y animarme durante todo este tiempo;

- la familia Nursery: Antonio “profe”, Ricardo, Andrés, Badiola y Javi, os llevaré toda la vida en el alma. Vosotros y el “maldito rocanrol” me habéis hecho sentir vivo y que mi ánimo y mi sangre fluyeran con fuerza en los momentos de debilidad; sois grandes, muy grandes;

- y la familia de la cuarta planta (de ellos ya se habla): Mamen, Tomás y sus “oncoratones”, Lis, Isa y Juan Ignacio (10<sup>6</sup> gracias por “la terapia Navarra”), “Susanas”, Rosa, Nacho, Julia, Maribel, Deme, Mavi, Sebastian, Álex, Emu, Toño, Antuán, Nuria, David, Raquel y Nieves.

Mis inicios en la Ciencia tuvieron lugar en la Escuela de Técnicos del *auténtico* Puerta de Hierro. Allí, además de la Inmunología, descubrí una cantidad de buena gente que aún hoy siguen llamándome y preocupándose por mí, y yo siempre ocupado. Blanca, Carmen, Mercedes, Carlos, Gonzalo, Maribel, Cati, Pilar, Marian y Flor (cuánto se te echa de menos). Sois esenciales en mi vida porque fuisteis el comienzo de esto que continúa en el *otro* Puerta de Hierro.

En un aparte, que ni el tiempo ni estos horarios “de país occidental desarrollado” lograrán que me olvide de ellos, quedan Mar, Juan Carlos, Marcos y Ana (amistades y vivencias de cuando era difícil ser amigos); Álvaro, Olga, Guillermo, Jose, Lorena, Charo, Davides, Paloma, Javi, Jacobo, Josele, Alicia... la gente de Biológicas (gracias a vosotros acabé la carrera y pude llegar aquí); y los recientes Dani Burgui y la gente de Surko, Eva Martínez, Jose Medina, Carlos Schmieder y Manuel Cancio (a lo largo de estos años me habéis escuchado, animado e interesado por mi trabajo).

Con especial cariño agradezco a la gente de Inmuno y de Medicina Interna la acogida y la ayuda prestada: en especial, a Tito Estefanía (para mí eres Doctor), Mariví, Carlos Vilches, Eduardo Suárez, Natalia, Helena, “las Charos”, Belén, Isabel, María Jesús Juan Antonio Vargas y Raquel. También a Jose, por ayudarme a mantener el orden en el animalario; a Cristina, que desde su nuevo “fortín de libros” me ha ofrecido artículos, accesos y sonrisas; a Isabel Millán, por ser “significativamente paciente” a pesar de las prisas, los datos, las “enes” y las “pes”; a Candelas, Ana, Sonia y Emi, por su labor oscura; y a toda la gente que investiga o ayuda de cualquier modo a la investigación en este hospital.

Gracias también a mi tutor de los cursos de doctorado, Alberto Muñoz, por su disponibilidad absoluta y a Luis del Peso, por su comprensión. Especialmente agradezco a todos los compañeros Investigadores que han colaborado de manera decisiva aportando material, conocimientos, tiempo y ayuda técnica a este trabajo: Francisco J. Blanco, de la Unidad de Biología Estructural, CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia; Baldo Oliva y Jaume Bonet, del Laboratorio de Bioinformática Estructural, Unidad de Investigación Bioinformática, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona; y Peter Kristensen, del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Aarhus, Dinamarca.

¡Se puede hacer ciencia y sonreír a la vez! Este que escribe fue el último en aterrizar en un grupo ya consolidado del Hospital y fue recibido de manera excepcional. Para este grupo, mi lectura supone el final de la aventura de las Tesis y eso supone que ellos son un poco más doctores también. Muchísimas gracias a Antonio Sánchez, hablamos el mismo idioma, no lo olvides nunca; Carlos Parada, el hombre tranquilo ¡la guerra que te di mientras escribías!; Javier Hernández, un referente de todo tipo; Linah Kilany, deberían darte el título de Doctora *Honoris causa*; y Juan Guinea, el hombre discreto, en la sombra, pero siempre ahí. Me acogisteis sin tener obligación alguna y vuestra paciencia, ayuda, consejos y buen ánimo fueron fundamentales para mí, sois el ejemplo de buena gente. Por supuesto que también están Paz, Ricardo Sánchez, Gelu, Clara, César Corbacho y Paloma.

Más cercanos en el espacio-tiempo estáis David Ordóñez *el torero* (cuando tenga pasta te compraré una buena peluca, no eso que llevas), Manuela y Elisa (muy pacientes con mis ironías e insolencias, gracias). A los ex-vecinos de “sótano-garaje-animulario-zulo” (¡por fin compartimos un pasillo con luz y ventanas!): Jose Miguel, Gemma, Javi, Vanesa, Mercedes, Raquel, Irene y Cris (otra gran familia de buena gente). Qué cómodo me encuentro con vosotros; aparte de charletas en pasillos y autobús, hemos tenido buenos momentos de consejos y ayudas con experimentos ... y lo que no son experimentos ¿eh Jose?; gracias por compartir vuestros conocimientos conmigo. No puedo olvidarme ni dejar de agradecer a Rosa, Miguel Ángel, Trini, Rocío y Nuria la ayuda, la predisposición y las sonrisas, os deseo lo mejor.

Compañeros de bancada y sin embargo amigos: Laura, un apoyo científico mejor que PubMed y una gran paciencia (perdona por haberte abandonado estos meses de escritura y por molestarte los ratos en que estaba); Vanesa, un espíritu crítico y una risa exquisita (pero ríe más); David, otro que va a dar mucho de qué hablar, un genio y una gran persona (sólo te falla lo de Bosé “m’cachilomengue”); Patricia, siempre dispuesta a participar (y a fumar, ese tabaco...); María, toda una revelación y una pérdida (suerte con tus “negocios”); Ana, la sonrisa y apoyo permanente (da gusto que te dé los buenos días); y Noelia, el mundo se te queda pequeño (no pares y cómetelo). A vosotros qué contaros que no sepáis, si habéis vivido/sufrido en directo todo el proceso. Daros las gracias es poco por vuestra ayuda constante y comprensión en mis momentos complicados. Como le dijo Josefina a la Guardia personal de Napoleón: “Gracias por todo lo que me habéis dado”.

A mi Director de Tesis, el Dr. Luis Álvarez-Vallina, pues lo que soy en un laboratorio y lo que consiga en el futuro se lo debo a él. Gracias por enseñarme, por tu tiempo, tu confianza, apoyo y por encontrar la luz cuando yo estaba a oscuras y perdido.



A lo largo de la vida uno hace amistad con personas por las que debe dar infinitas gracias a los dioses; ellas son Marta y Víctor, Víctor y Marta (darán que hablar, tiempo al tiempo). Que sepáis que sin vosotros esta Tesis no existiría y que debería ser obligatorio tener gente como vosotros en el labo. Impagables los recuerdos, las risas y las penas, las bromas, los miedos, los proyectos y demás historias vividas con vosotros; os quiero.

Como todos los doctorandos que tienen mascotas las nombran, no seré menos. Pero éstos no es que me hayan ayudado mucho. Claro, que si despertarme todos los días a las 6:30-7:00 se puede considerar “una ayuda”, pues muchas gracias, Miliki y Pepe, por los arañazos, mordiscos y madrugones de apoyo (yo sigo sin verlo, que conste).

Si media Tesis es de Marta y Víctor, la otra media es de Andrea (algún día diréis con orgullo “yo la conozco”, yo ya lo hago). Mi mejor Amiga y mi mayor Alegría. Gracias por soportar a un elemento como yo, que quiso estudiar Biología, y por aguantarle mientras estaba haciendo la Tesis. Si el pasado ha tenido sombras y dudas, tú las has despejado con honestidad, sabiduría y cariño; y si el presente aparece confuso, tú confías y te lanzas; te mereces lo mejor. La Tesis es pasado, el futuro es nuestro.

## **RESUMEN**

"Cuando despertó, el dinosaurio todavía estaba allí."

El dinosaurio  
(Microrrelato de Augusto Monterroso)

## **ESTRATEGIAS DE MULTIMERIZACIÓN PARA LA GENERACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES CON UTILIDAD DIAGNÓSTICA Y TERAPÉUTICA**

En este proyecto se generaron varios tipos de agentes multivalentes y multifuncionales, integrando anticuerpos recombinantes en formato monocadena (scFv) en armazones proteicos derivados de la proteína III del bacteriófago (scFv-DI/DII) o derivados del dominio NC1 del colágeno XVIII (scFv-NC1) murino.

La fusión con el DI indujo multimerización efectiva del scFv, que fue expresada por células eucarióticas genéticamente modificadas, en forma funcionalmente activa. La expresión *in situ* de esta proteína de fusión indujo una respuesta inmunológica específica de tipo Th1, demostrando su potencial en protocolos de inmunoterapia activa.

A partir de regiones derivadas del dominio NC1, se generaron dos tipos de agentes: i) mediante la fusión de un scFv con la región de trimerización del dominio NC1, se generó un anticuerpo trimérico (“*Trimerbody*”) con propiedades funcionales y físico-químicas superiores a las del scFv monomérico; y ii) mediante la fusión de un scFv, con actividad antiangiogénica, con el dominio NC1 completo, que incluye el inhibidor endógeno de angiogénesis endostatina, se generó un reactivo multivalente y multifuncional con mayor actividad antiangiogénica, tanto *in vitro* como *in vivo*.

## **MULTIMERIZATION STRATEGIES FOR RECOMBINANT ANTIBODIES GENERATION WITH DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC APPLICATIONS**

In this work, different multivalent and multifunctional agents, comprising single chain Fv antibodies (scFv) fused with protein scaffolds from bacteriophage protein III (scFv-DI) or from NC1 domain from XVIII collagen (scFv-NC1), were generated.

The scFv-DI fusion induced functional multimerization and expression of active proteins by gene-modified mammalian cells. *In situ* expression of scFv-DI protein induced *in vivo* Th1-specific immune response, suggesting a potential role as an adjuvant for DI-domain in immunotherapy.

From NC1 subdomain regions, two different scFv-NC1 agents were generated: i) a trimeric antibody (“*Trimerbody*”) was generated by scFv fusion to the NC1 trimerization domain, which improved the functional, physical, and chemical properties of its monomer counterpart in *in situ* anti-tumoral therapeutic applications, or in diagnostic applications; and ii) a multivalent and multifunctional antibody was generated by fusion to the complete NC1 domain, which includes the endogenous angiogenesis inhibitor endostatin, with better anti-angiogenic properties both *in vitro* and *in vivo*.

## ÍNDICE

“Voy de negro y te preguntas el porqué  
porque no visto otros colores, sé muy bien  
que mi apariencia puede resultar sombría y gris  
tengo razones para vestir así.

[...]

Voy de negro por el joven que caerá  
en la guerra creyendo tener detrás  
a dios y a su madre de su lado y no es verdad.  
Es la carne del juego de un general.

[...]

Quiero enseñar un arco iris al cantar  
pero en mi espalda cae la oscuridad  
y hasta que la luz no brille de verdad  
voy de negro y de negro me verás.”

El hombre de negro  
*The Man in Black*  
(J. Cash)

<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>12</b>
<b>CLAVE DE ABREVIATURAS</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>20</b>
1- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTICUERPOS .....	21
1.1- Estructura y función	21
1.2- Generación de anticuerpos monoclonales <i>in vivo</i>	23
2- INGENIERÍA DE ANTICUERPOS .....	25
2.1- Aislamiento de los genes variables de un anticuerpo monoclonal y generación de fragmentos recombinantes	25
2.2- Quimerización y humanización de anticuerpos monoclonales de origen murino	26
2.3- Generación de anticuerpos monoclonales <i>in vitro</i>	28
TECNOLOGÍA DE PRESENTACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA SUPERFICIE DE LOS FAGOS FILAMENTOSOS.....	28
2.3.2- Otras tecnologías de selección	31
2.4- Modificación de las características funcionales y físico-químicas de los anticuerpos	31
2.4.1- Anticuerpos biespecíficos	31
2.4.2- Multimerización	32
2.4.2.1- Modificación de la longitud del <i>linker</i>	33
2.4.2.2- Dominios de oligomerización	34
2.4.3- Estrategias de estabilización	36
3- EXPRESIÓN <i>IN SITU</i> DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS .....	36
3.1- Anticuerpos intracelulares	37
3.2- Anticuerpos solubles	38
3.3- Anticuerpos expresados como proteínas de fusión	38
<b>OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>42</b>
1- LÍNEAS CELULARES.....	43
2- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS .....	43
3- CONSTRUCCIONES GÉNICAS .....	44
3.1- Vectores de expresión	44
3.1.1- Vectores de expresión en células procariotas	44
3.1.2- Vectores de expresión en células eucariotas	45

4- TRANSFECCIONES .....	48
5- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	48
6- ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS EN FASE SÓLIDA (ELISA).....	48
6.1- Elisa para la detección de anticuerpos funcionales	48
6.2- Elisa para la detección de anticuerpos circulantes	49
6.3- Elisa para la detección y cuantificación de citoquinas	50
7- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA .....	50
7.1- Estudios estructurales	50
7.1.1- Cromatografía analítica de filtración en gel	50
7.1.2- Ultracentrifugación analítica por velocidad de sedimentación	50
7.2- Ensayos de proteólisis y estabilidad <i>in vitro</i>	51
7.2.1- Procesamiento proteolítico	51
7.2.2- Ensayos de estabilidad	51
7.3- Estudios de afinidad mediante resonancia de plasmón superficial	51
8- MODELADO COMPARATIVO DE PROTEÍNAS.....	52
9- CONJUGACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES CON CIANINA 5.....	52
10- CITOMETRÍA DE FLUJO .....	53
10.1- Expresión de antígenos en la superficie celular	53
10.2- Cuantificación de citoquinas circulantes	53
11- TRANSFERENCIA <i>WESTERN</i> .....	53
12- ESTUDIOS FUNCIONALES .....	53
12.1- Ensayos de proliferación celular	53
12.2- Ensayos de migración celular	54
12.3- Ensayos de angiogénesis <i>in vitro</i>	54
13- ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	54
13.1- Anestesia	55
13.2- Inmunizaciones	55
13.3- Ensayos de implantación tumoral	55
13.4- Ensayos de imagen molecular con anticuerpos recombinantes multivalentes	55
14- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.....	56
<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
1- MULTIMERIZACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES MEDIANTE FUSIÓN CON PROTEÍNAS VIRALES .....	58
1.1- Diseño de construcciones génicas para la expresión de anticuerpos monocadena Fv (scFv) como proteínas de fusión con dominios de la proteína III de la envoltura del bacteriófago M13	58

1.2- Caracterización estructural y funcional	59
1.3- Diseño de una construcción génica para la expresión de un scFv como proteína de fusión con el dominio DI de la proteína pIII en células eucarióticas	60
1.4- Estudio de la respuesta inmune humoral y celular frente al scFv L36 y a la proteína de fusión scFv L36-DI	61
2- MULTIMERIZACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES MEDIANTE FUSIÓN CON PROTEÍNAS EUCARIÓTICAS.....	64
2.1- Diseño de una construcción génica formada por un anticuerpo recombinante en formato scFv y la región de trimerización del dominio NC1 del colágeno XVIII	64
2.1.1- Caracterización estructural y funcional	64
2.2- Diseño de construcciones génicas para la expresión de trímeros scFv-NC1 <sup>ES-</sup> ( <i>Trimerbodies</i> ) con diferente especificidad	66
2.2.1- Estudio de la especificidad	66
2.2.2- Estudio de la afinidad mediante resonancia de plasmón superficial	68
2.2.3- Generación de <i>trimerbodies</i> biespecíficos	69
2.2.4- Estudios de estabilidad <i>in vitro</i>	70
2.2.5- Estudios de localización de depósitos tumorales <i>in vivo</i>	71
2.2.5.1- Conjugación de los <i>trimerbodies</i> con cianina 5	71
2.2.5.2.- Estudios de imagen molecular <i>in vivo</i>	71
2.2.6- Estudio farmacocinético: biodistribución y aclaramiento renal	73
2.2.7- Efecto terapéutico de un <i>trimerbody</i> expresado localmente	75
2.3- Diseño de una construcción génica formada por un anticuerpo recombinante en formato scFv y el dominio NC1 del colágeno XVIII completo	77
2.3.1- Efecto combinado de la endostatina y del scFv L36 sobre la formación de estructuras capilariformes <i>in vitro</i> .	77
2.3.2- Caracterización estructural y funcional	78
2.3.3- Procesamiento proteolítico	80
2.3.4- Efecto terapéutico de la proteína de fusión scFv L36-NC1 <sup>ES+</sup> expresada localmente	81
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>83</b>
1- LA PROTEÍNA III DEL BACTERIÓFAGO: “ESCENARIO O ACTOR” EN LA PRESENTACIÓN DE REPERTORIOS .....	84
2- LA PROTEÍNA III DEL BACTERIÓFAGO: “AYUDANTE” DEL PLEGAMIENTO Y “ADYUVANTE” INMUNOLÓGICO.....	86
3- ARMAZONES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR: “NUEVAS IDEAS” PARA MEJORAR LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS Y FARMACOCINÉTICAS DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES.....	87

4- ARMAZONES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR: “MEJORA” FUNCIONAL Y “APORTE” DE FUNCIONES.....	90
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>96</b>



## CLAVE DE ABREVIATURAS

x y z t

+ -

C H O N P S

A U G C T

Do Re Mi Fa Sol La Si Do

AAT	Antígeno Asociado a Tumor
Ac	Anticuerpo
AcBis	Anticuerpo Biespecífico
AcHz	Anticuerpo Humanizado
AcMo	Anticuerpo Monoclonal
AcQ	Anticuerpo Quimérico
AcR	Anticuerpo Recombinante
ADEPT	<i>Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy</i> , enzimas activadoras de drogas
Ag	Antígeno
BSA	Seroalbúmina bovina
CDC	Citotoxicidad mediada por complemento
CDRs	Regiones determinantes de complementariedad o regiones hipervariables
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CH	Dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina
CL	Dominio constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina
CLS	<i>Capillary Like-Structure</i> , Estructuras Capilariformes
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> , ensayo inmunoenzimático en fase sólida
ES	Endostatina
Fab	Fracción de la Ig que contiene la cadena ligera y los dominios VH y CH <sub>1</sub> de la cadena pesada. Es la responsable de la unión al antígeno ( <i>antigen binding</i> )
Fc	Fracción cristalizable. Porción de la inmunoglobulina formada por las cadenas pesadas (salvo el dominio CH <sub>1</sub> ) de la que dependen sus funciones efectoras
FcR	Receptor para la porción Fc expresado por diferentes células del sistema inmune
FcRn	Receptor Fc neonatal
FR	<i>Framework Regions</i> , regiones marco o entramado
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratumoral
i.v.	Intravenosa
IFA	Adyuvante incompleto de Freund
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IMAC	<i>Immobilised Metal Affinity Chromatography</i> , columna de afinidad de iones metálicos inmovilizados
IEA	Inhibidor Endógeno de Angiogénesis
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido

LM	Laminina
MB	Membrana Basal
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Proteasa de la matriz extracelular
NIP	4-hidroxi, 3-nitro, 5-iodofenilacetil
s.c.	Subcutáneo/a
scFv	<i>Single Chain Fragment Variable</i> , anticuerpo recombinante monocadena
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> , resonancia del plasmón superficial
TP	Tecnología de presentación
TPPF	Tecnología de presentación de péptidos y proteínas en la superficie de fagos filamentosos
VH	Región Variable de la Cadena Pesada de la Inmunoglobulina
VL	Región Variable de la Cadena Ligera de la Inmunoglobulina

## INTRODUCCIÓN

“Para afirmar que el hombre es el descendiente modificado de alguna forma preexistente es menester averiguar antes si varía en sí mismo, por poco que sea, en su conformación corporal y facultades mentales, y caso de ser así, si las variaciones se transmiten a su prole siguiendo las leyes que rigen para los animales inferiores, tales como la de la transmisión de los caracteres a la misma edad o sexo. [...] La investigación debería después tratar de dilucidar la importante cuestión de si el hombre tiende a multiplicarse con bastante rapidez para que nazcan vigorosas luchas por la vida, cuyo resultado ha de ser la conservación en la especie de las variaciones ventajosas del cuerpo y del espíritu y la consiguiente eliminación de las que son perjudiciales. Las razas o especies humanas, llámeselas como se quiera, ¿se sobreponen mutuamente y se reemplazan unas a otras hasta el punto de llegar a extinguirse algunas?”

El origen de las especies

*On the Origin of Species by Means of Natural Selection  
or the Preservation of Favoured Races on the Struggle for Life*

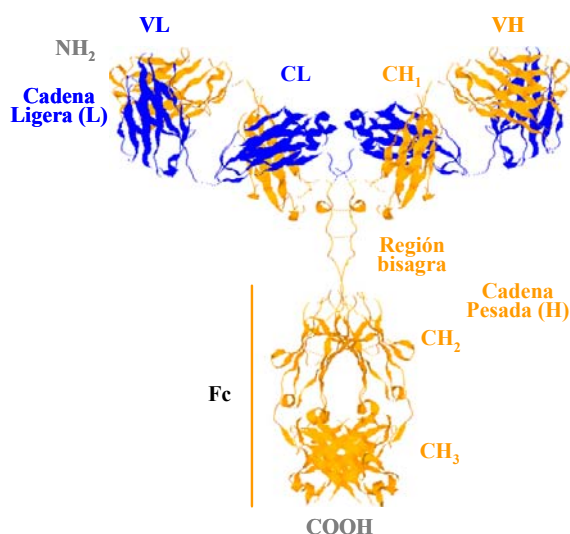
(Charles R. Darwin)

## 1- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTICUERPOS

### 1.1- Estructura y función

El sistema inmune permite al huésped disponer de células y moléculas extraordinariamente específicas para las múltiples sustancias patógenas o antígenos (Ag) presentes en el medio ambiente. Los anticuerpos (Acs) o inmunoglobulinas (Igs) son los efectores de la rama humoral del sistema inmune adaptativo. Los Acs funcionan como la parte específica del denominado “complejo receptor de células B” (BCR), que reconoce al Ag a nivel de la membrana del linfocito B ( $L_B$ ), y como moléculas circulantes secretadas por las células plasmáticas procedentes de la activación, proliferación y diferenciación del linfocitos B (43).

Los Acs poseen una estructura básica simétrica, con un peso molecular aproximado de 150 kDa (Figura 1). Cada molécula está formada por dos cadenas polipeptídicas pesadas (cadenas H, del inglés *heavy*) idénticas, de peso molecular entre 55 y 70 kDa, unidas por puentes disulfuro, y dos cadenas ligeras (cadenas L, del inglés *light*), de 25 kDa, igualmente idénticas entre sí, que se unen individualmente a cada una de las cadenas H mediante interacciones covalentes y no covalentes (39). Tanto las cadenas H como las cadenas L están formadas por dominios estructurales de aproximadamente 110 aminoácidos, conocidos como “plegamientos o dominios de Ig”. Cada uno de estos dominios Ig presenta un puente disulfuro intracatenario esencial para el plegamiento y la funcionalidad de la molécula. Existen 2 tipos de cadenas L: kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ); y cinco tipos de cadenas H: mu ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ), gamma ( $\gamma$ ), alfa ( $\alpha$ ) y epsilon ( $\epsilon$ ). Su combinación da lugar a las cinco clases de Igs existentes: IgM, IgD, IgG, IgA y IgE, respectivamente. Las cadenas H y L se componen de regiones aminoterminales variables (V) y de regiones carboxiterminales constantes (C). Cada cadena H está formada por un dominio variable (VH) y tres -o cuatro en el caso de las IgM e IgE- dominios constantes ( $CH_1$ - $CH_4$ ). Por su parte, cada cadena L está formada por dos dominios, uno variable (VL) y otro constante (CL).



**Figura 1.** Estructura tridimensional de una molécula de IgG humana. Una IgG está formada por dos cadenas pesadas (CH) y dos cadenas ligeras (CL) y contiene dos zonas variables (cada una compuesta por una región VH y una VL), que confieren la especificidad de unión. El dominio Fc es la región efectora de la IgG encargada de activar el complemento y de unirse a diferentes tipos celulares.

Cada molécula de Ac presenta tres regiones unidas mediante un segmento polipeptídico flexible denominado “región bisagra”, que adquiere una forma similar a una “Y” (39; 40; 129) (Figura 1). Cada brazo de la Y (regiones Fab, del inglés *Antigen-binding Fragment*, Fragmento de unión al Ag de las Igs) está formado por la unión de una cadena L con los dominios VH y CH<sub>1</sub> de la cadena H. El tallo de la Y (región Fc, del inglés *crystallizable Fragment*, Fragmento cristizable) está formado por la asociación de los otros dominios CH de ambas cadenas H. Los puentes disulfuro que unen ambas cadenas H se forman a nivel de la región bisagra, confiriéndoles gran flexibilidad y permitiendo la unión a diferentes estructuras antigénicas.

La molécula de Ac tiene dos sitios de unión al Ag localizados en la región V (es bivalente y monoespecífica). Los dominios aminoterminales de ambas cadenas H y L presentan gran variabilidad de secuencia entre diferentes moléculas de Acs y determinan su especificidad antigénica. El centro de unión al Ag está constituido por tres segmentos no colineales, pertenecientes al dominio VH, y tres al dominio VL, que se yuxtaponen para formar una superficie o cavidad (parátipo) donde se aloja la región del Ag reconocida por el Ac (epítipo). Estos seis segmentos se denominan “regiones determinantes de complementariedad” (CDRs, del inglés *complementarity determining regions*) o regiones hipervariables (26). Las CDRs (CDR 1 a 3 de las cadenas H o L) se encuentran flanqueadas por 1-4 regiones marco (FR, del inglés *Framework Regions*) altamente conservadas. Los dominios carboxiterminales de ambas cadenas H constituyen la región Fc, responsable de las funciones efectoras: interacción con factores del complemento (CDC, del inglés *complement-dependent cytotoxicity*), opsonización, citotoxicidad dependiente de Ac (ADCC, del inglés *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), etc., además del anclaje de la molécula de Ig en la membrana celular a través de los receptores para la porción Fc de la Ig (FcγR, FcεR, FcαR) (89).

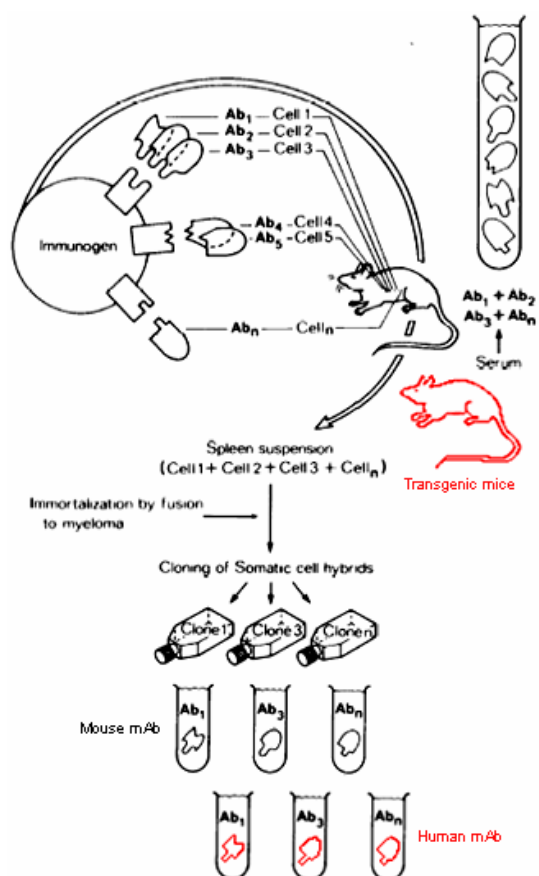
Una de las características fundamentales del sistema inmune es su capacidad para producir millones de Acs diferentes que reconocen específicamente una amplia variedad de Ags, independientemente de su origen (101). Al contrario de lo que ocurre en cualquier otra proteína, donde un gen controla la síntesis de una cadena peptídica, los genes de las regiones V de los Acs se ensamblan a partir de un numeroso grupo de genes más pequeños. Por ejemplo, la cadena H contiene 65 genes V (variables), 27 genes D (del inglés *Diversity*) y 6 genes J (del inglés *functional joining*). Las cadenas L también poseen varios genes V y J, pero no D. Este mecanismo de generación de diversidad permite obtener un amplio repertorio de Acs (repertorio primario) estimado en más de 10<sup>7</sup> especificidades de unión diferentes, que generalmente muestran afinidades bajas. La afinidad de la interacción Ag-Ac se incrementa a lo largo de una respuesta inmune, mediante un proceso conocido como “maduración de afinidad”. Esta maduración es el resultado de un proceso de hipermutación somática de los segmentos V reordenados y de la posterior selección por el Ag de aquellos mutantes con mayor afinidad por el mismo (76; 86).

## 1.2- Generación de anticuerpos monoclonales *in vivo*

Hasta el desarrollo de los Acs monoclonales (AcMos), el uso de los Acs con fines diagnósticos y/o terapéuticos se centraba únicamente en la utilización de antisueros. Estos antisueros se obtienen a partir de diferentes especies animales, tras la inmunización repetida con el Ag de interés. Los antisueros contienen una mezcla de Acs procedentes de la activación de distintos clones de L<sub>B</sub>, por lo que también se denominan “Acs policlonales”. Los antisueros reconocen el Ag inmunizante (inmunógeno) pero con distinta especificidad y afinidad, siendo difícil reproducir los ensayos (162).

El desarrollo de la tecnología del hibridoma en el año 1975 por George Köhler y César Milstein (97) ha supuesto una verdadera revolución en todos los campos de la biomedicina (Figura 2). El hibridoma es el resultado de la fusión de un L<sub>B</sub>, procedente del bazo de un animal inmunizado, con una célula de mieloma, que aporta al hibridoma la capacidad de dividirse indefinidamente. De esta forma, se obtienen Acs producidos por un clon celular (monoclonales) que derivan de un único L<sub>B</sub>. Estos AcMos son, por tanto, homogéneos, específicos de epítomos individuales y se pueden producir en grandes cantidades, lo que los convierte en reactivos perfectamente estandarizados. Por estas razones, los AcMos se han convertido en una herramienta básica con numerosas aplicaciones, tanto en la investigación biomédica, como en la industria y en la clínica, donde se utilizan con fines diagnósticos y terapéuticos (15; 162).

El procedimiento clásico para la generación de AcMos (Figura 2, negro) se inicia con la inmunización de un animal con el Ag o la mezcla antigénica de interés. Para facilitar la presentación antigénica y potenciar la respuesta inmune se emplean pautas de inmunización seriadas y sustancias adyuvantes (aceites, sales de aluminio, bacterias inactivadas, toxinas, etc.) (116; 141). Estas inmunizaciones suelen realizarse por vía intraperitoneal (i.p.), con una inmunización final por vía intravenosa (i.v.) unos días antes de sacrificar al animal. Tras la inmunización se obtienen los linfocitos B activados, generalmente del bazo del animal, y se fusionan, mediante el uso de agentes como el polietilenglicol (PEG), con una célula de mieloma deficiente en alguna de las enzimas necesarias para la síntesis de nucleótidos por la vía de rescate, bien la timidín kinasa (TK) o la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT). Tras la selección de hibridomas con medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina), que permite únicamente la supervivencia de células híbridas, se realiza el análisis (*screening*) de los sobrenadantes de cultivo mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA), citometría o transferencia *Western*, y se seleccionan aquel o aquellos hibridomas que expresan el AcMo deseado. El último paso del proceso implica la clonación del hibridoma para asegurar su monoclonalidad (162).



**Figura 2.** Esquema del protocolo original para la obtención de AcMos, según la técnica del hibridoma, con animales convencionales (negro) y con animales genéticamente modificados (rojo). Adaptación del diseño original de la *Nobel Lecture* de César Milstein en 1984 (<http://nobelprize.org/>). Homenaje a César Milstein y George Köhler.

La obtención de AcMos murinos es un procedimiento estándar que ha experimentado pocos cambios desde su descripción original (97). Son numerosos los AcMos que se han generado a partir de cepas de ratones normales, dirigidos frente a numerosas dianas que abarcan campos tan diversos como la microbiología, virología, inmunología, neurofisiología, endocrinología, etc. Sin embargo, su uso clínico presenta importantes limitaciones que derivan de su origen no humano: corta vida media sérica, ineficiente reclutamiento de funciones efectoras y problemas inmunológicos. Una proporción importante de los pacientes tratados con AcMos murinos desarrollan respuestas inmunes dirigidas frente a las IgGs murinas (HAMA), provocando en unos casos la pérdida de eficacia, y en otros una reacción inmune generalizada potencialmente grave (93).

Con el fin de salvar estos obstáculos y obtener AcMos humanos, se han ensayado diferentes estrategias. Una primera aproximación fue la generación de hibridomas a partir de mielomas humanos. Sin embargo, esta técnica es más compleja que su homóloga en ratón, ya que los mielomas humanos son difíciles de cultivar *in vitro*. Otra aproximación fue la immortalización de linfocitos B humanos con el virus de Epstein-Barr (VEB) o mediante la fusión de linfocitos B humanos con mielomas murinos establecidos. Desafortunadamente, las dificultades técnicas -junto con un bajo rendimiento e inestabilidades de los cultivos- han hecho abandonar esta líneas de generación de AcMos humanos, abordando este proceso mediante



técnicas de la manipulación de células embrionarias (ratones transgénicos) y de ingeniería genética.

La generación de líneas de ratones transgénicos (Figura 2, rojo), con sistemas inmunes “humanizados”, representa un hito importante. Los transgenes que portan estos ratones presentan gran parte del repertorio de los genes V humanos en línea germinal, lo que permite el desarrollo de una población de linfocitos B y la formación de un amplio y diverso repertorio primario de Acs humanos. Estos ratones son capaces de generar Acs humanos de afinidad intermedia/alta, ya que pueden introducir mutaciones en los genes de las Ig humanas por el mecanismo de hipermutación somática en sus linfocitos B maduros. La introducción de *loci* de las Igs humanas para la generación de diversas cepas de ratones productores de Acs humanos, se ha llevado a cabo usando distintos vectores, como los *miniloci*, los cromosomas artificiales de levaduras (YACs) y humanos (HACs) y los vectores P1 (28).

Estos ratones transgénicos se cruzan posteriormente con ratones a los que se les han eliminado genes de Igs endógenas para, finalmente, conseguir un ratón que sólo sea capaz de producir Igs humanas. Los animales pueden ser inmunizados con cualquier Ag y utilizar sus bazos para la obtención de hibridomas mediante el protocolo convencional.

## 2- INGENIERÍA DE ANTICUERPOS

Con el objetivo de generar AcMos humanos, se empezaron a desarrollar nuevas técnicas moleculares que han dado origen a los “AcMos de segunda generación” o “Acs recombinantes” (AcR): fragmentos de Ac (FAcs), Acs quiméricos (AcQs) y Acs humanizados (AcHzs). El desarrollo de estas tecnologías ha sido posible gracias al conocimiento de la estructura molecular y de la organización genética de las Igs (favorecido por la organización modular y el alto grado de conservación evolutiva), a los avances en los procedimientos de clonación y transferencia génica, y a la disponibilidad de vectores de expresión para células procariotas y eucariotas.

### 2.1- Aislamiento de los genes variables de un anticuerpo monoclonal y generación de fragmentos recombinantes

El aislamiento y clonación de los genes V representa el primer objetivo en muchos proyectos de ingeniería de Acs. Las razones para el aislamiento pueden ser: i) terapéuticas, para quimerizar o humanizar un AcMo con actividad biológica en modelos preclínicos; ii) estratégicas, dado que para algunas aplicaciones es necesario modificar la estructura (formato) del Ac y generar fragmentos recombinantes; o iii) prácticas, debido a la inestabilidad y reducida capacidad de secreción de algunos hibridomas (8).

La estrategia de aislamiento más utilizada se basa en la amplificación de regiones V, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos cebadores que hibridan en los extremos relativamente conservados de las regiones V. Antes del desarrollo de esta técnica, la única posibilidad de obtener AcRs funcionales era mediante la acción de proteasas. El fragmento Fab se obtiene por digestión con papaína y está formado por el apareamiento de la cadena L (dominios VL-CL) con los dominios VH y CH<sub>1</sub>. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> se obtiene por digestión con pepsina y corresponde con el extremo aminoterminal de las dos cadenas H y L. El fragmento Fv está formado por las regiones VH y VL, donde se sitúa el sitio activo del Ac. Por su tamaño (25 kDa), los Fv son vehículos ideales para numerosas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, pero las interacciones débiles que unen las regiones V los hacen muy inestables a temperaturas fisiológicas. Para mejorar la estabilidad y preservar la conformación de este tipo de fragmentos recombinantes se han desarrollado diferentes estrategias, entre las que destacan la introducción de puentes disulfuro o la adición de un conector peptídico flexible (*linker*) entre los genes de las regiones V.

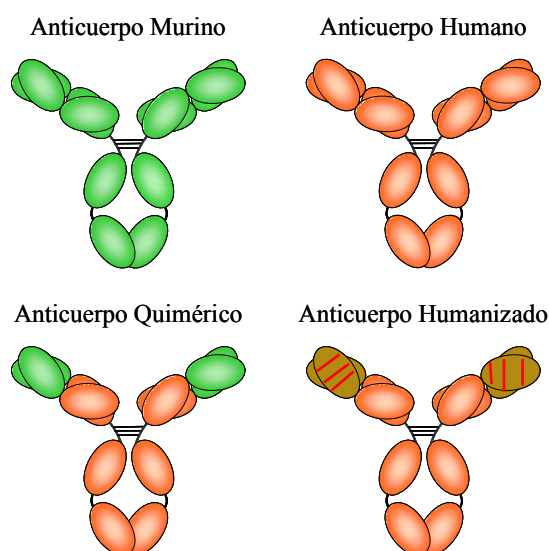
En la década de los 80 del pasado siglo, se publicaron varios trabajos en los que se demostró la producción en *E. coli* de un fragmento Fv recombinante, en el que los dominios VH y VL estaban unidos físicamente por un *linker* de 15-20 aminoácidos (19; 80). Este *linker* permite el apareamiento intramolecular de ambos dominios, para formar un sitio de unión al Ag funcional. Estas construcciones se denominaron “anticuerpo recombinante monocadena” o “scFv” (del inglés *single chain Fv*), y han sido expresados con éxito en bacterias, levaduras, células de insecto y células de mamífero (79). El formato scFv es uno de los más utilizados para generar AcRs y proteínas de fusión, así como para la construcción de repertorios.

## 2.2- Quimerización y humanización de anticuerpos monoclonales de origen murino

Un AcQ se define como una molécula artificial cuyas regiones V provienen de una Ig murina y cuyas regiones C, de una Ig humana (Figura 3). Con la quimerización se reduce la inmunogenicidad y se potencian las funciones efectoras de la molécula murina, manteniendo la especificidad y afinidad del AcMo original. El proceso de quimerización implica el aislamiento de los genes de las regiones VH y VL del hibridoma secretor del AcMo, su inserción en vectores de expresión que contengan genes de una región CH o CL humana y la posterior selección de los transformantes, a partir de células de mamífero, para la producción y posterior purificación del AcQ (25; 56; 75; 113). Numerosos trabajos han demostrado que los AcQs murino-humano purificados a partir del sobrenadante de cultivo de las células transfectadas son funcionalmente activos, interaccionan de forma específica con la diana reconocida por el AcMo murino original, son capaces de mediar funciones efectoras de forma eficiente (como CDC y ADCC) y son mejor tolerados (79). Como resultado, se han generado una gran variedad de

AcQs, algunos de los cuales han sido aprobados para uso terapéutico (8). El listado de todos los Acs aprobados o en fase clínica se pueden consultar en organismos oficiales internacionales, como la Agencia Europea del Medicamento (EMA, [www.ema.europa.eu/home.htm](http://www.ema.europa.eu/home.htm)), o la FDA (*US Foods and Drugs Administration*, [www.fda.gov](http://www.fda.gov)).

Algunos AcQs son capaces de inducir respuestas inmunes dirigidas frente a los AcQs (HACA del inglés *Human Anti-Chimeric Antibodies*). Esta inmunogenicidad es debida al reconocimiento de epítomos situados en los dominios V murinos. Para reducir la inmunogenicidad de los AcMos terapéuticos, se desarrollaron las moléculas “humanizadas” o *human-like* (63; 85; 138). Esta tecnología consiste en el trasplante de las CDRs de un AcMo murino, entre las FRs de un dominio V humano (*CDR grafting*). De este modo, generamos un dominio V híbrido ratón-humano y transferimos una especificidad de reconocimiento determinada a una molécula que es completamente humana en el resto de su secuencia. La principal ventaja de los AcHzs es que los epítomos potencialmente inmunogénicos asociados a las regiones FRs murinas están ausentes (89).



**Figura 3.** Diagramas esquemáticos de diversos tipos de AcMos: murinos, humanos, quiméricos y humanizados.

Las desventajas de este proceso son por un lado su complejidad y, por otro, que no siempre se elimina la inmunogenicidad del AcHz, pues se han observado casos de respuestas inmunes dirigidas frente a los AcHzs (HAHA del inglés *Human Anti-Humanized Antibodies*) (163). Además, la manipulación e inserción de CDRs murinas en un contexto de FRs humanas condiciona una disminución de la afinidad de la interacción Ag-Ac (175).

Entre los abordajes para mejorar la afinidad del Ac, destacan: i) la remodelación de la superficie (*resurfacing* o *veneering*), que consiste en la humanización de los VH y VL, sustituyendo selectivamente los residuos más expuestos de las FRs murinas (126); ii) el

remodelado (*reshaping*), que consiste en la sustitución de residuos clave de las FRs humanas por murinas (167); y iii) la “superhumanización”; es decir, la sustitución de las CDRs no homólogas entre las murinas y las humanas (163).

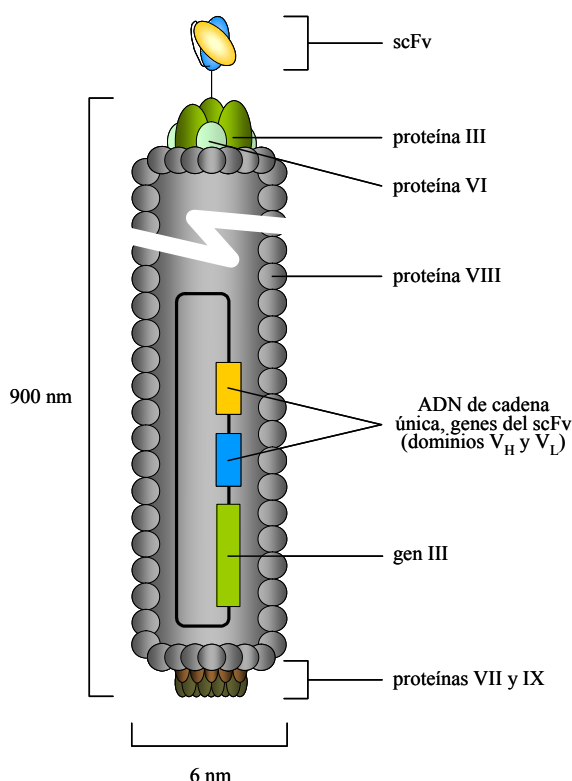
## **2.3- Generación de anticuerpos monoclonales *in vitro***

La idea de imitar al sistema inmune para generar AcMos a través de la identificación de parejas receptor-ligando, es provocadora y se ha abordado desde diferentes perspectivas, imitando los pasos del sistema inmune para la generación de Acs *in vivo*: i) generación de diversidad genotípica; ii) mantenimiento de la relación directa genotipo-fenotipo; iii) aplicación de la presión selectiva mediante las rondas de selección; y iv) amplificación del genotipo seleccionado (74).

### **2.3.1- Tecnología de presentación de proteínas en la superficie de los fagos filamentosos**

Entre los repertorios “genéticos”, la tecnología que más atención ha recibido, por su simplicidad y versatilidad, es la de tecnología de presentación (TP) de proteínas en la superficie de fagos filamentosos (TPPF; en inglés, *Phage Display Technology*). Los fagos filamentosos son bacteriófagos atemperados del género *Inovirus*, que tienen como características principales presentar un ADN de cadena única e infectar bacterias Gram-negativas de forma lisogénica, lo que permite la generación de múltiples copias de partículas víricas sin que esto suponga la lisis de la bacteria infectada (174). Los fagos tienen una morfología cilíndrica de 900 nm de largo por 6 nm de diámetro y están constituidos por una envoltura proteica en cuyo interior se encuentra una molécula de ADN circular de cadena única de 6,4 kilobases (Figura 4). La cápside está constituida mayoritariamente por la proteína VIII (2.700 copias/fago), y por las proteínas III, VI, VII y IX, como proteínas minoritarias (Figura 4) (160).

En la década de los ochenta del pasado siglo, George Smith (157) demostró que el genoma del bacteriófago podía ser manipulado con facilidad para obtener partículas virales con péptidos fusionados a las proteínas de la envoltura, y que estos péptidos podían ser reconocidos mediante Acs específicos. Esta observación es el origen de la TPPF, que se basa en la fusión de colecciones de genes a aquellos genes que codifican alguna de las proteínas de la envoltura del fago. Como resultado se producen bacteriófagos, cada uno de los cuales expone un único tipo de proteína en su superficie. Esta asociación física entre fenotipo y genotipo es la característica fundamental de la TPPF (52).



**Figura 4.** Representación esquemática de un bacteriófago filamentoso M13. En él se muestra la localización de las principales proteínas de la envoltura y el genoma, en forma de ADN monocadena, que contiene las secuencias codificantes para las regiones variables ( $V_H$  y  $V_L$ ) de un Ac.

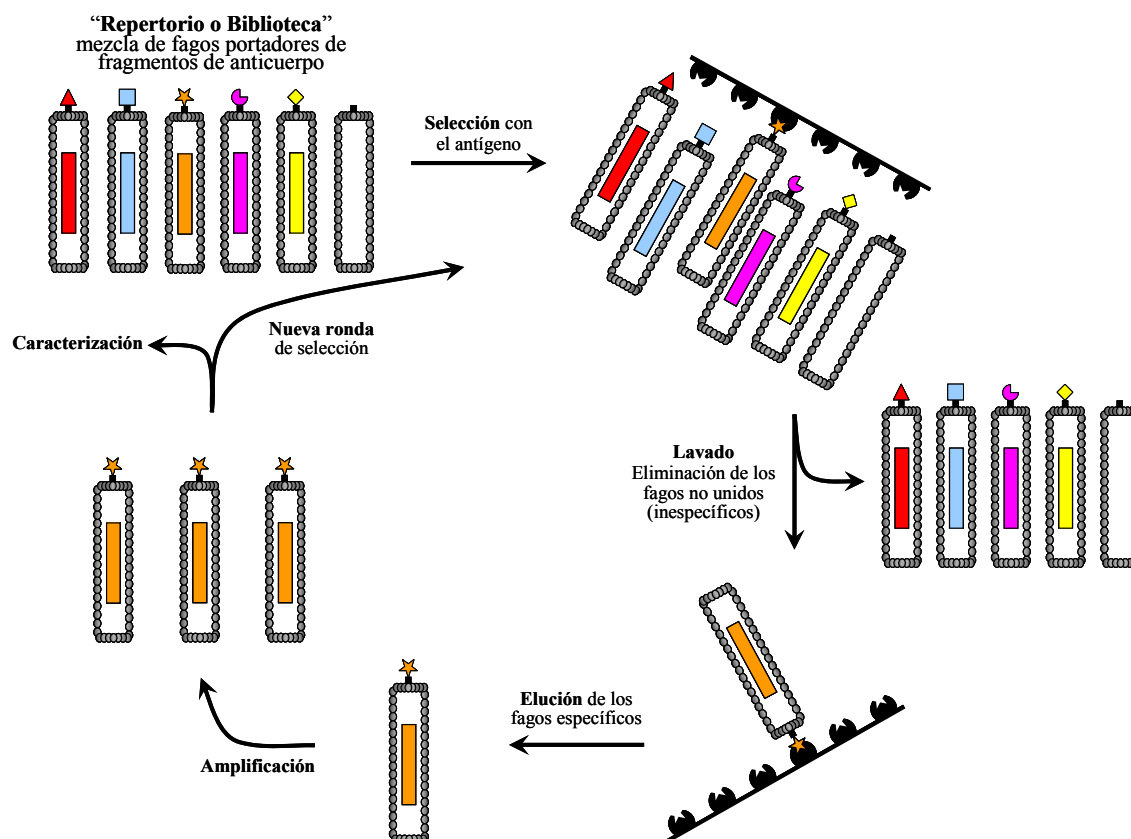
El contexto más empleado para la fusión y presentación de Acs son las proteínas III y VIII. En ambos casos, la inserción de la secuencia se realiza en el extremo aminoterminal. La presentación en el contexto de la proteína VIII es multivalente, explota el fenómeno de la avidéz y permite “capturar” aquellos fagos que forman uniones débiles con el ligando. Por el contrario, las bibliotecas de presentación monovalentes emplean la proteína III (3-5 copias/bacteriófago) y se usan en situaciones donde se precisan interacciones de mayor afinidad. Para la construcción de genotecas se han desarrollado dos tipos fundamentales de vectores: el sistema de un solo gen (1 vector/fago), que permite la producción de fagos que presentan la proteína de fusión en todas las copias de la proteína correspondiente de la cápside; y el sistema de dos genes, que permite la producción de fagos que contienen una mezcla de las proteínas naturales de la cápside, con un número limitado de copias con la secuencia fusionada. Este último sistema se basa en el uso de vectores plasmídicos llamados “fagómidos”, que contienen la región intergénica del fago filamentoso M13, el cual permite su empaquetamiento como ADN de cadena única en el interior de los virus. Estos vectores son de menor tamaño que el genoma del fago, fáciles de manipular genéticamente y contienen únicamente el gen de la proteína de la cápsida empleada en la fusión. En este sistema, la infección con un fago *helper* aporta los genes necesarios para la síntesis de todas las proteínas virales y la formación de bacteriófagos. La composición de los fagos resultantes es mixta, pues combinan las proteínas naturales provenientes del fago *helper* con las proteínas de fusión codificadas en el fagómido (52).

Los aspectos fundamentales de una biblioteca de AcRs son, el formato del Ac y la naturaleza y diversidad del repertorio. Para la construcción de repertorios de AcRs en fagos

filamentosos, se han empleado scFvs y sistemas de presentación monovalente, que determinan una selección basada en la afinidad del Ac. La generación del repertorio se ha basado en dos estrategias. La amplificación de repertorios endógenos/naturales de regiones V, mediante PCR (33; 132); y el diseño y construcción de repertorios totalmente sintéticos sobre la base del conocimiento de la estructura y la diversidad de las Igs (94; 128; 159). La probabilidad de encontrar Acs con capacidad de unión a dianas diferentes depende, en gran medida, del tamaño de la genoteca. Los genes de las regiones V obtenidas se clonan en vectores fagómidos y se emplean para transformar bacterias. El número de bacterias transformadas representa el tamaño de la genoteca y la diversidad. Cuando las regiones V provienen de un individuo inmunizado es posible aislar AcRs contra el Ag, incluso a partir de genotecas pequeñas ( $10^6$  miembros). Sin embargo, la utilidad de estas genoteca “inmunes” es muy limitada, pues se debe inmunizar al donante o aprovechar su respuesta en el contexto de una infección o enfermedad autoinmune, y sería necesario construir una nueva genoteca para cada Ag. Frente a ello, un repertorio universal que funcione como fuente de sitios de unión contra cualquier Ag es mucho más atractivo, y las genotecas actuales tienen diversidad y afinidad significativas ( $10^{10}$  miembros y sitios de unión con afinidades en el rango nanomolar e, incluso, subnanomolar).

La selección de los bacteriófagos se puede realizar empleando Ags purificados (proteínas, hidratos de carbono o lípidos) o mezclas antigénicas, mediante un procedimiento denominado *biopanning* (Figura 5) que se basa en la afinidad entre las moléculas expuestas en la superficie del bacteriófago y el ligando deseado, generalmente unido a una fase sólida. A continuación, se realiza un proceso de lavado para eliminar los fagos no específicos y una elución de los fagos específicos unidos al ligando. Debido a que la secuencia que codifica el péptido o Ac se encuentra en el genoma del bacteriófago, la secuencia aminoacídica expuesta puede ser deducida a partir de la secuencia nucleotídica de los fagos seleccionados (52).

La caracterización de los clones seleccionados se realiza mediante ensayos de unión (ELISA, citometría, etc.), tanto en el “contexto” del fago con el AcR expresado como proteína de fusión en su superficie, como AcR soluble. Posteriormente, se realiza la caracterización molecular de los clones seleccionados. Se amplifica mediante PCR la región de ADN correspondiente al AcR y se digiere con una enzima de restricción de corte frecuente, produciendo un patrón típico de digestión que se asemeja a la “huella dactilar” de cada AcR (*fingerprinting*). La caracterización molecular se completa mediante la secuenciación de las regiones V (52).



**Figura 5.** Esquema del proceso de selección de un repertorio de Acs presentado en la superficie de bacteriófagos (*biopanning*). En un primer paso, se seleccionan aquellos bacteriófagos que presentan en su superficie un Ac con capacidad de unión al Ag. Tras eliminar los clones inespecíficos, se eluyen los fagos unidos y se amplifican *in vitro* para realizar rondas de selección adicionales.

### 2.3.2- Otras tecnologías de selección

Al igual que la TPPF, estas tecnologías o plataformas se basan en dos conceptos básicos: i) la preparación de mezclas complejas (repertorios) de moléculas; y ii) el diseño de métodos de selección que permitan identificar la unión específica de elementos del “repertorio” creado y el ligando de interés. Entre ellas cabe destacar las TP en la superficie de microorganismos como levaduras (*Yeast surface display*) (21), bacterias (*Bacteria display*) (107) y retrovirus (*Retrovirus display*) (165), así como en la superficie de células de mamífero (31; 177). Existen otras tecnologías que forman complejos entre el Ac y el DNA (122; 133), entre el Ac y el mRNA de forma covalente (173), o, recientemente, el *Ribosome Display* donde el Ac forma complejo con el propio ribosoma (65; 108).

## 2.4- Modificación de las características funcionales y físico-químicas de los anticuerpos

### 2.4.1- Anticuerpos biespecíficos

Los Acs biespecíficos (AcBis) son moléculas “artificiales” con dos sitios de unión al Ag de diferente especificidad. Se han diseñado AcBis destinados a redirigir toxinas, radioisótopos,

enzimas, citoquinas y drogas citotóxicas, hacia las células tumorales pero la mayoría de los AcBis han sido diseñados para unir un Ag asociado a tumor (AAT), presente en la célula tumoral, y una molécula activadora de una célula del sistema inmune. Las moléculas efectoras más utilizadas son cadenas del complejo TCR-CD3 de la célula T y receptores Fc (CD16, CD64, y CD89) de las células NK (*Natural Killer*), monocitos y macrófagos (8).

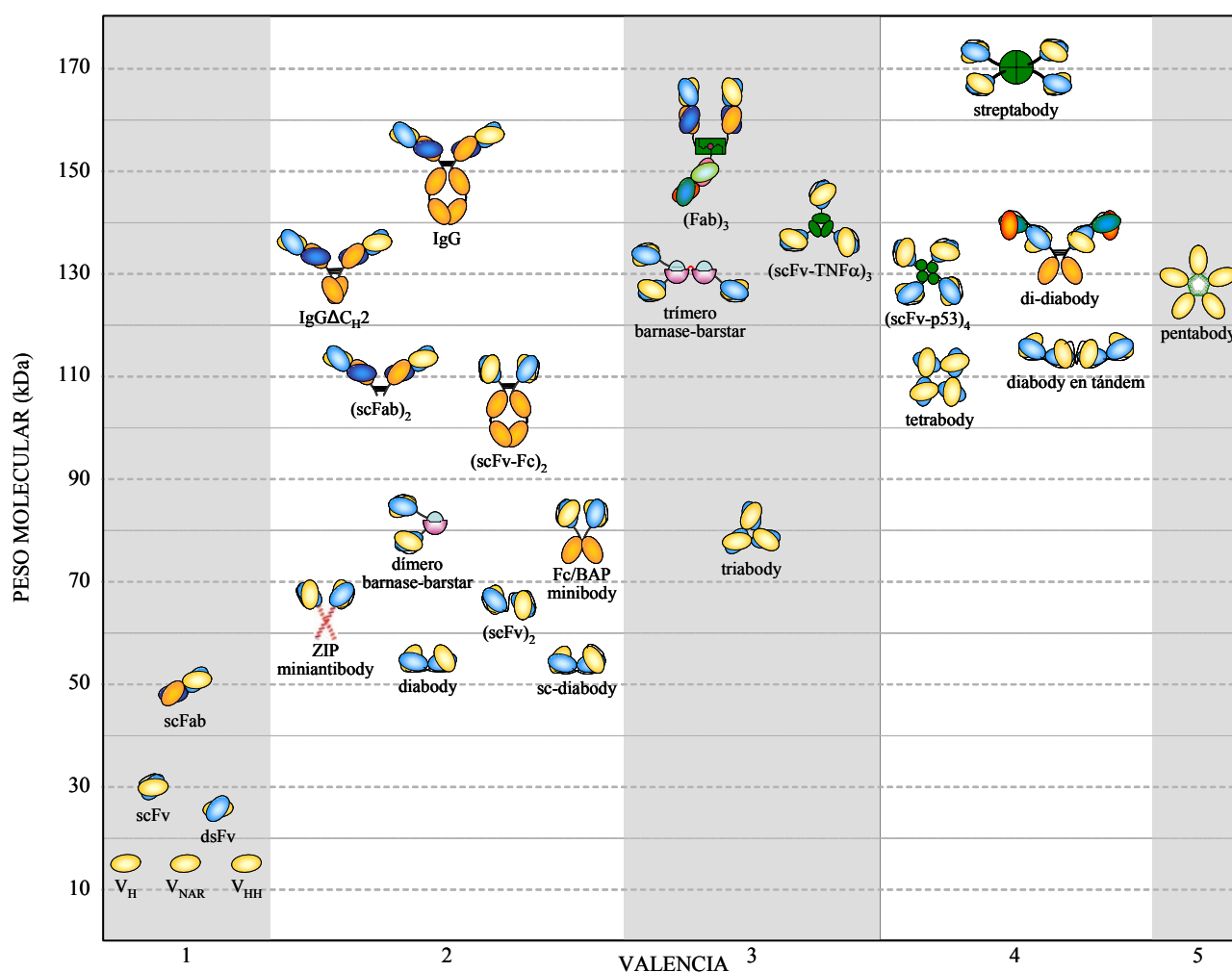
Los primeros AcBis eran moléculas de Ig completas o fragmentos (Fab')<sub>2</sub> obtenidos a partir de dos AcMos distintos por un método de conjugación química, o mediante la técnica de los hibridomas híbridos (111). El potencial terapéutico de estos AcBis se confirmó en diferentes modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, las dificultades en su producción y purificación, los problemas derivados de la presencia de secuencias murinas (inmunogenicidad) y de la porción Fc (activación inespecífica), así como su baja capacidad de penetración en los tumores sólidos han limitado su aplicación clínica. Las limitaciones que presentaban los AcBis de primera generación se han solventado mediante el desarrollo de las técnicas de ingeniería de Acs. Estas técnicas permiten la construcción de AcBis mediante fusión de dos sitios de unión al Ag, directamente a nivel génico. Existen diferentes formatos de AcBis recombinantes, pero hoy en día los más utilizados son los derivados de fragmentos Fv (20).

#### 2.4.2- Multimerización

Algunas características de los AcMos nativos -su tamaño y su prolongada vida media- representan limitaciones para su utilización *in vivo* como herramienta diagnóstica o terapéutica. Esta vida media tan larga se debe a que su tamaño está por encima del umbral de filtración glomerular y a su capacidad para unirse al denominado receptor Fc neonatal (FcRn), que protege las IgG de su degradación en el endosoma. Este receptor, que reconoce una zona en la región Fc de la IgG situada en la unión entre los dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>, es expresado por las células endoteliales (CEs) (8). Los AcRs que carecen de la región Fc, como los fragmentos Fab o scFv, ofrecen una serie de ventajas: i) son fáciles de producir en sistemas bacterianos; ii) se extravasan más eficazmente; y iii) tienen una capacidad de penetración tisular superior a las de los AcMos nativos. Sin embargo, su vida media es muy corta, ya que las proteínas recombinantes con un tamaño inferior a 60 kDa son filtradas por el glomérulo y excretadas rápidamente por la orina.

Para aumentar la vida media de los AcRs se han propuesto diferentes estrategias, siendo la más obvia la multimerización. Otra estrategia consiste en la producción de AcRs biespecíficos que reconocen simultáneamente su Ag diana y las Igs séricas, con lo que no sólo recuperan las funciones efectoras ligadas a la región Fc, sino que también prolongan su vida media (115). Otra alternativa eficaz es la conjugación con PEG, que produce un aumento del tamaño molecular por encima del límite de filtración glomerular en el riñón, al tiempo que disminuye la inmunogenicidad del AcR (176).





**Figura 6.** Clasificación, según peso molecular (kDa) y valencia, de los principales fragmentos recombinantes derivados de Acs. Aparecen únicamente aquellos Acs que han sido utilizados en ensayos de imagen molecular o de los que se han descrito características funcionales y/o estructurales que demuestran su multivalencia.

El objetivo de las estrategias de multimerización es la obtención de AcRs multivalentes, mediante la asociación de dos o más dominios de unión a través de *linkers* de longitud variable, o mediante el uso de proteínas de fusión compuestas por dominios de unión y dominios de oligomerización (de origen procariótico o eucariótico). En la Figura 6 se destacan aquellas estrategias de multimerización más utilizadas, clasificando los AcRs resultantes según peso molecular y valencia.

#### 2.4.2.1- Modificación de la longitud del *linker*

En el mayoría de los scFvs, los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> están unidos físicamente por un *linker* de 15-20 aminoácidos, formado por una repetición de residuos glicina y serina (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, que proporciona flexibilidad y solubilidad. Este *linker* permite el apareamiento intramolecular de ambos dominios para formar un sitio de unión al Ag funcional. En cambio, utilizando *linkers* más cortos (10 o 5 aminoácidos) se impide el apareamiento intramolecular entre los dos

dominios de una misma cadena, por lo que se produce un apareamiento de los dominios VH y VL de dos cadenas distintas, creando dos sitios de unión al Ag. Estos fragmentos bivalentes, que se conocen como *diabodies* (30 kDa) (Figura 6), presentan una mayor afinidad funcional o avidéz, siendo particularmente útiles para determinadas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas (71). Si el espaciador peptídico es eliminado completamente y ambos dominios se expresan como un polipéptido continuo, entonces el resultado es la formación de trímeros de 80 kDa o tetrámeros de 110 kDa, denominados *triabodies* o *tetrabodies* (37; 78; 82) (Figura 6).

A partir de dos AcRs distintos, A y B, se pueden unir en la misma cadena polipeptídica, el dominio VH de uno de los AcRs y el dominio VL del otro AcR, y viceversa, obteniéndose dos cadenas:  $VH_A-VL_B$  y  $VH_B-VL_A$ , que si son coexpresadas en la misma célula, se ensamblan para formar dímeros con dos sitios de unión al Ag distintos, denominados "diabodies biespecíficos" (70; 75; 109; 180). También se pueden unir las dos cadenas del *diabody* con un *linker*, dando lugar según su longitud a un *diabody* de cadena única (*sc-diabody*), si es un *linker* largo, o a una molécula tetravalente denominada "*diabody en tándem o tandab*", si es un *linker* corto (92). También es posible combinar dos scFvs introduciendo un *linker* adicional entre el extremo carboxiterminal del primer scFv y el extremo aminoterminal del segundo scFv, obteniéndose fragmentos  $(scFv)_2$  mono o biespecíficos (2; 4) (Figura 6). La misma estrategia ha sido llevada a cabo con el scFab, obteniendo su variante  $(scFab)_2$  (11).

Es importante destacar que, aun siendo una de las estrategias más utilizadas, la modificación de la longitud del *linker* no es el único factor determinante o promotor de la multimerización. Cada AcR debe estudiarse individualmente, ya que otros factores influyen en este proceso (37; 55; 98; 120; 121).

#### 2.4.2.2- Dominios de oligomerización

En 1989 se demostró que los dominios de dimerización ricos en leucina (*zipper* o cremalleras de leucina), presentes en las proteínas nucleares JUN y FOS y en los reguladores de transcripción GCN4 (en levaduras) y C/EBP (en células de mamífero), presentaban excelentes propiedades para promover la formación de complejos oligoméricos (120; 121). Estos conocimientos fueron aprovechados por Peter Pack y Andreas Plückthun que, en 1992, describieron el *miniantibody* (64 kDa), una proteína de fusión homodimérica compuesta por la cremallera de leucina de GCN4, la región bisagra de la IgG3 murina y el scFv anti-fosfocolina McPC603 (125). La ventaja de este diseño reside en que recupera la bivalencia de las Igs, reduciendo su peso molecular. Posteriormente, con un diseño similar (bivalentes y homodiméricos) se desarrollaron distintos AcRs, entre los que cabe destacar el *minibody* (80 kDa) diseñado en 1996 por el grupo de Anna M. Wu, en el que un scFv se une al dominio  $CH_3$  de una IgG a través de un *linker* (Figura 6). Estos AcRs multiméricos presentan excelentes propiedades farmacocinéticas y se expresan eficientemente en células eucariotas (77).

A partir de estos trabajos pioneros, se han desarrollado nuevos diseños de AcRs multiméricos que buscan mantener la “fisonomía” del Ac nativo (diseños ortodoxos o continuistas), bien mediante la incorporación de dominios CH ( $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_4$  de las IgG e IgE humanas) a AcRs con formato scFv (23; 155); con formato *diabody*, para generar Acs bivalentes o tetravalentes biespecíficos (*di-diabodies*), respectivamente (105); o bien, mediante la incorporación de dominios de homodimerización de origen procariótico, como la fosfatasa alcalina (50). Cabe destacar la tecnología denominada “botón en ojal” (del inglés *knob-into-hole*), basada en el intercambio de un residuo “pequeño” por uno “grande” en dos dominios  $\text{CH}_3$  fusionados con diferentes scFv, permitiendo con ello la interacción fisicoquímica entre las dos cadenas polipeptídicas y la generación de heterodímeros biespecíficos que mantienen el formato de *minibody* (137).

Una estrategia de multimerización reciente y novedosa consiste en la utilización del complejo que forma la ribonucleasa bacteriana *barnasa* (12 kDa), con su inhibidor natural *barstar* (10 kDa) (35). Mediante la generación de proteínas de fusión que contienen un scFv y la *barnasa* o el *barstar*, se pueden obtener Acs diméricos y triméricos de 85 y 130 kDa, respectivamente. Este formato de AcR multimérico con un scFv anti-HER2 es capaz de internalizarse específicamente en células tumorales HER-2 positivas e inducir apoptosis (41).

El desarrollo de las técnicas de cristalografía y de las estrategias de resolución estructural, asociado a la disponibilidad de numerosos datos funcionales, ha posibilitado el empleo de nuevos dominios para el diseño de una nueva generación de AcR multiméricos (diseños heterodoxos o rupturistas), que no tienen los impedimentos estructurales de algunos formatos ya mencionados, este es el caso de los *triabodies* y *tetrabodies*. Así por ejemplo, la fusión de un scFv al factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ , del inglés  $\alpha$ - *Tumor Necrosis Factor*), permitió generar homotrímeros activos, unidos no covalentemente y con un peso molecular aproximado de 140 kDa (24) (Figura 6). Ambos dominios de la proteína de fusión, el scFv y el  $\text{TNF-}\alpha$ , son funcionalmente activos y su efecto terapéutico es superior al del  $\text{TNF-}\alpha$  aislado (24; 64).

Mediante la fusión de un scFv con el complejo estreptavidina-biotina, se han obtenido AcRs tetraméricos de 170 kDa, denominado *streptabody*. Este formato es muy estable y permite la incorporación de scFvs con la misma o diferentes especificidades (91). Un formato similar, AcRs tetraméricos monoespecíficos de aproximadamente 130 kDa, surgen mediante la fusión del dominio de tetramerización de p53 con un scFv (135) (Figura 6).

La utilización multímeros tiene como desventaja un aumento considerable del peso molecular y, la más que probable, pérdida de flexibilidad de los dominios de unión. Por estos motivos, para generar AcR pentavalentes, se emplearon Acs monodominio derivados de una clase especial de Acs de camélidos (camellos, llamas, etc.) que carecen de cadenas L. Los *camelbodies* ( $\text{VH}_H$ , del inglés *heavy chain only VH*) presentan una secuencia similar a la

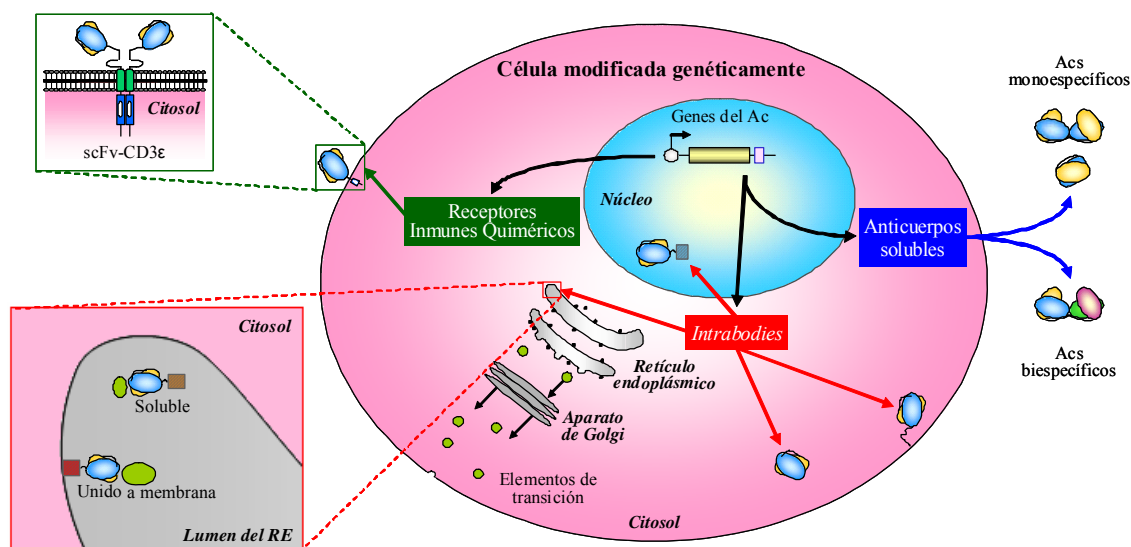
subfamilia VH<sub>3</sub> humana, lo que posibilita su utilización en clínica humana. Mediante la fusión de un VH<sub>H</sub> (15 kDa) con la subunidad B de verotoxina de *E. coli*, se generó un AcR pentavalante y monoespecífico, denominado *pentabody* (178) (Figura 6).

### 2.4.3- Estrategias de estabilización

Existen numerosas aproximaciones para estabilizar AcRs multiméricos basadas en la formación de uniones covalentes (puentes disulfuro o grupos tiol) entre los monómeros de Acs. Los primeros intentos de estabilización trataban de conjugar los dominios VH y VL recombinantes mediante puentes disulfuro. Se generaban Fv recombinantes (dsFv) (27; 54) que precisaban un plegamiento previo (*refolding*) antes de su unión covalente (Figura 6). Sin embargo, la modificación de la estructura original del AcR puede resultar en bajos rendimientos -especialmente en sistemas procarióticos- así como en la pérdida de sitios de unión por plegamientos incorrectos. Aun así, sigue siendo uno de los métodos más utilizados por su capacidad de estabilizar AcRs multiméricos, como los *diabodies* (14) o los *minibodies* (77; 105; 124; 155). Recientemente, se ha utilizado esta estrategia para generar un nuevo formato de Ac mediante el método *dock and lock* (140). En él, se combina: i) la capacidad de la subunidad reguladora de proteína quinasa A de homodimerizar no covalentemente, formando el DDD (del inglés, *Dimerization and Docking Domain*); y ii) la capacidad de la proteína de acoplamiento de la quinasa A de acoplarse mediante puentes disulfuro al DDD. Así, cada dominio lleva fusionado en el extremo aminoterminal un Fab, generando un Ac trivalente biespecífico de, aproximadamente, 150 kDa (Figura 6).

## 3- EXPRESIÓN *in situ* DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS

Actualmente, el tratamiento con los AcMo aprobados para su uso terapéutico se realiza mediante inyección de la proteína purificada. Dado que su vida media es limitada, la administración debe ser repetida a fin de conseguir unos niveles séricos adecuados. Este tratamiento tiene un coste muy elevado, y podría ser sustituido por estrategias genéticas que permiten una producción de AcRs constante y sostenida en el tiempo (146). Diferentes trabajos han demostrado la capacidad de células humanas modificadas genéticamente para procesar adecuadamente y secretar AcRs en cantidades apreciables y en forma funcionalmente activa (5; 20; 60; 88; 170). Estos AcRs se pueden liberar al medio o redirigirse a diferentes compartimentos celulares (Figura 7).



**Figura 7.** Expresión *in situ* de AcRs. Las células humanas modificadas genéticamente (células humanas, células inmunes o células progenitoras) pueden procesar y expresar AcRs en cantidades apreciables y en forma funcionalmente activa. Estas estrategias incluyen la producción de AcRs solubles (mono o biespecíficos), la expresión en compartimentos subcelulares específicos (*intrabodies*) y la expresión de AcRs como proteínas de fusión en la superficie celular (receptores inmunes quiméricos).

### 3.1- Anticuerpos intracelulares

Los AcRs se pueden expresar y dirigir hacia compartimentos celulares específicos cuando se les incorporan las secuencias apropiadas para el tráfico intracelular (146; 156). Estos AcRs se denominan *intrabodies* (Figura 7) y han demostrado su eficacia no sólo para desviar proteínas de su compartimiento habitual o bloquear interacciones entre proteínas implicadas en vías de señalización, sino también para activar proteínas intracelulares como la caspasa 3 (130) o restaurar la actividad transcripcional de formas mutantes de p53 (30). En su aplicación oncológica, esta estrategia se ha focalizado en neutralizar proteínas implicadas en la proliferación tumoral, como ciclina E y c-myb (mediante *intrabodies* dirigidos al núcleo), p21 y MDR (con *intrabodies* expresados en el citoplasma), o EGFR y erb2 (con *intrabodies* que se retienen en el retículo endoplásmico) (104). Así, un adenovirus que codifica un scFv anti-erb2 ha sido testado en fase I de ensayo clínico en pacientes con cáncer de ovario (6). Recientemente, se ha descrito un *intrabody* que bloquea en el retículo endoplásmico, la expresión de dos receptores proangiogénicos: VEGFR-2 y Tie-2 (84). Los *intrabodies* también tienen gran potencial en el tratamiento de infecciones víricas, pues pueden neutralizar proteínas clave en el ciclo vital vírico. Por ejemplo, la expresión intracelular de un scFv anti-CXCR4 (coreceptor de gp120) es capaz de inhibir la infección por HIV-1 (104).

### 3.2- Anticuerpos solubles

La secreción *in vivo* de AcRs (Figura 7) se ha descrito usando tanto vectores virales como no virales. Diferentes tipos celulares (mioblastos, fibroblastos, hepatocitos) transducidos *ex vivo* con vectores virales son capaces de expresar AcRs *in vivo*, durante periodos prolongados, una vez reintroducidos en ratones singénicos, aunque los niveles de AcRs alcanzados en suero son bajos. Mediante la inyección intramuscular (i.m.) o i.v. de vectores adenovirales que portan los genes correspondientes, se ha conseguido incrementar entre 100 y 200 veces los niveles de AcRs circulantes y, lo que es más importante, se ha conseguido demostrar el efecto terapéutico de estos AcRs producidos *in vivo* (145). Recientemente, se ha descrito un adenovirus que codifica un scFv anti-VEGF que, tras su administración sistémica, retrasa el crecimiento tumoral (5). Este trabajo determina que una sola inoculación del adenovirus tiene el mismo efecto terapéutico que la de varias inyecciones de altas dosis del scFv recombinante. Asimismo, los vectores no virales también han demostrado su eficacia. En un modelo murino, la inyección intratumoral (i.t.) de un vector que codifica un scFv anti-laminina (L36) con actividad anti-angiogénica produjo una inhibición del crecimiento de tumores establecidos (148).

Esta estrategia también se puede usar para la producción de AcBis. Recientemente, se ha demostrado la estabilidad y funcionalidad de un *diabody* biespecífico para el Ag carcinoembrionario (CEA) y el modulo CD3 del receptor específico del linfocito T (TCR-CD3), que puede ser secretado por diferentes tipos de células humanas (20). Así, en modelos animales, la expresión i.t. de moléculas de *diabody*  $\alpha$ CEA/ $\alpha$ CD3, o su liberación sistémica, retrasó de forma significativa el crecimiento de los tumores establecidos, tras la administración de linfocitos T humanos (146).

### 3.3- Anticuerpos expresados como proteínas de fusión

Con el objetivo de incrementar la actividad antitumoral de los  $L_T$ , se han desarrollado distintos protocolos de modificación génica. Uno consiste en redirigir la especificidad de la célula efectora mediante el uso de receptores inmunes quiméricos (RIQ) (146). Los RIQs son proteínas de fusión formadas por un dominio de reconocimiento unido a las porciones transmembrana e intracelular de una proteína con capacidad de transducir la señal. La porción extracelular del RIQ que redirige la célula efectora hacia el tumor es, normalmente, un scFv. La capacidad de señalización intracelular la aporta, por lo general, la porción citoplasmática de una cadena del complejo TCR-CD3 del linfocito T. Estos RIQs se expresan como receptores funcionales en la membrana del linfocito T y, tras su interacción con el Ag, emiten señales de activación similares a las observadas tras la interacción fisiológica mediada por el complejo TCR-CD3 (42). Esta interacción Ag específica, independiente del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) dispara la secreción

de citoquinas y puede mediar la citolisis de las células diana que expresan el Ag reconocido por el RIQ. Las citoquinas secretadas pueden reclutar o modular otros componentes del sistema inmune en la vecindad del tumor, provocando una respuesta inflamatoria que contribuiría al rechazo del tumor.

La efectividad de los RIQs ha sido demostrada en modelos animales en los que linfocitos T autólogos, transducidas *ex vivo* con un gen que codifica para un RIQ tumor-específico, se localizan en las áreas tumorales y son capaces de prevenir su crecimiento. Recientemente, se ha publicado el primer ensayo clínico en el que se demuestra regresión tumoral en pacientes con melanoma metastático, utilizando esta estrategia (7).

## OBJETIVOS

“Vine a Madrid para matar a un hombre a quien no había visto nunca.”

Beltenebros  
(Antonio Muñoz Molina)



- I. Analizar el efecto de los dominios I y II de la proteína III del bacteriófago sobre el rendimiento, la estabilidad y la funcionalidad de un anticuerpo recombinante monocadena.
- II. Valorar la capacidad de estas proteínas virales para inducir respuestas inmunes.
- III. Estudiar la capacidad de dominios de trimerización derivados del colágeno para generar anticuerpos multivalentes.
- IV. Construir y caracterizar una nueva generación de agentes antiangiogénicos multivalentes y multifuncionales, mediante la integración de anticuerpos recombinantes en armazones proteicos derivados de la matriz extracelular, que contienen inhibidores endógenos de angiogénesis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

“15.00 Decido recorrer sistemáticamente la ciudad en lugar de permanecer en un sitio fijo. Con ello disminuyo las probabilidades de no encontrar a Gurb en un trillón, pese a lo cual, el resultado sigue siendo incierto. Camino siguiendo el plano heliográfico ideal que he incorporado a mis circuitos internos al salir de la nave. Me caigo en una zanja abierta por la Compañía Catalana de Gas.

15.02 Me caigo en una zanja abierta por la Compañía Hidroeléctrica de Cataluña.

15.03 Me caigo en una zanja abierta por la Compañía de aguas de Barcelona.

15.04 Me caigo en una zanja abierta por la Compañía Telefónica Nacional.

15.05 Me caigo en una zanja abierta por la asociación de vecinos de la calle Córcega.

15.06 Decido prescindir del plano heliográfico ideal y caminar mirando por dónde piso.”

Sin noticias de Gurb  
(Eduardo Mendoza)

## 1- LÍNEAS CELULARES

En la Tabla 1 se indican las líneas celulares utilizadas en este trabajo y las condiciones de cultivo.

TABLA 1		Líneas celulares			
Línea celular	Proveedor-Referencia	Tipo celular	Especie	Medio de cultivo	Suplementos
293T	ATCC <sup>1</sup> CRL-11268	Fibroblasto de riñón embrionario	Humano	DMEM-C <sup>2</sup>	-
B16F10	ATCC CCL-6475	Melanoma	Ratón	DMEM-C	-
HEK-293	ATCC CRL-1573	Fibroblasto de riñón embrionario	Humano	DMEM-C DMEM-L <sup>3</sup>	-
HeLa	ATCC CCL-2	Carcinoma de cérvix	Humano	DMEM-C	-
HeLa <sup>CEA</sup>	P. Holliger <sup>4</sup> (67)	Carcinoma de cérvix	Humano	DMEM-C	G418 <sup>5</sup> (750 µg/ml)
HT1080	ATCC CCL-121	Fibrosarcoma	Humano	DMEM-C	-
MKN45	JCRB-0254 <sup>6</sup>	Carcinoma gástrico	Humano	RPMI-C <sup>7</sup>	-

<sup>1</sup>ATCC: *American Type Culture Collection* (EE.UU.).

<sup>2</sup>DMEM-C (DMEM Completo): Medio DMEM suplementado con un 10% (vol/vol) de suero bovino fetal (FCS), y con una mezcla de 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina.

<sup>3</sup>DMEM-L (DMEM Libre de Suero): Medio DMEM suplementado con un 0.1% (vol/vol) de FCS, y con una mezcla de 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina.

<sup>4</sup>Dr. P. Holliger, *Medical Research Council* (MRC), Cambridge, Reino Unido.

<sup>5</sup>G418: también llamado Neomicina.

<sup>6</sup>JCRB: *Japanese Collection of Research Bioresources* (JAPÓN).

<sup>7</sup>RPMI-C (RPMI Completo): Medio RPMI suplementado con un 10% (vol/vol) de FCS, y con una mezcla de 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina.

Todos los medios de crecimiento y suplementos se obtuvieron de LONZA. Las células se cultivaron a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS

Los esplenocitos se obtuvieron a partir del bazo de ratones BALB/c (Harlan Ibérica) previamente inmunizados. Los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> y los bazos se extrajeron en ambiente estéril. Los bazos se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) (pH 7,4) frío, se disgregaron mecánicamente, y se pasaron a través de un filtro de nylon estéril de 0,40 µm (Falcon, BD Biosciences). Después de un lavado (1200 rpm, 5 minutos a 4 °C) las células se resuspendieron en 5 ml de solución de hemólisis (0,15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>4</sub> y 0,1 mM EDTA) y tras 5 minutos a temperatura ambiente, se paró la reacción mediante la adición de 9 ml

de PBS. Después de este paso, las células se lavaron 2 veces (1200 rpm, 5 minutos a 4 °C) con medio completo. La viabilidad celular de las preparaciones fue siempre superior al 90 %.

Las células endoteliales primarias aisladas de vena de cordón umbilical humano (HUVEC; del inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) proporcionadas por Mónica Feijóo (Hospital Universitario La Princesa, Madrid, España), se cultivaron en medio EGM-2, suplementado con un 2% (vol/vol) de suero bovino fetal (FCS), y un cóctel de factores de crecimiento (LONZA).

### 3- CONSTRUCCIONES GÉNICAS

Para propagar y clonar los vectores se utilizaron bacterias *E. coli* TOP-10. Las bacterias transformadas con los distintos plásmidos se cultivaron a 37 °C en medio sólido TYE o en medio líquido 2xYT (ambos de Invitrogen), suplementados con 50 µg/ml de ampicilina (Invitrogen). Todas las técnicas generales de ADN recombinante se llevaron a cabo según métodos estándar (143). Las enzimas utilizadas en los clonajes fueron de New England Biolabs. El ADN plasmídico se purificó empleando *kits* de aislamiento de QIAGEN. Los oligonucleótidos sintéticos se obtuvieron de Roche. Las construcciones se revisaron por secuenciación usando el método de los dideoxinucleótidos y un secuenciador de ADN automático ABI-PRISM (Perkin Elmer).

#### 3.1- Vectores de expresión

##### 3.1.1- Vectores de expresión en células procariotas

Los vectores empleados y los vectores generados en este trabajo aparecen detallados en la Tabla 2. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla 3.

Tabla 2		Vectores de expresión en procariotas		
Vector	Vector de origen	Inserto	Características	Proveedor-Referencia
pHEN2	pUC119	gen III (DI-DII-DIII)		L. Álvarez-Vallina (148)
pUC119-L36		scFv L36	Promotor lac Sitio de unión al ribosoma de lacZ	
pKBJ1	pUC119-L36	scFv L36-DI-DII-6His-myc	Región líder pelB	Este trabajo
pKBJ2		scFv L36-DI-6His-myc-DII	Resistencia a ampicilina Etiqueta 6His-myc	Este trabajo
pKBJ3		scFv L36-DI-6His-myc		Este trabajo

**Tabla 3** Oligonucleótidos utilizados para la generación de los vectores de expresión en procariotas

Nombre	Secuencia (5'–3')
p1	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCGGGGCCGCAACTGTTGAAAGTTGTTTAGC
p2	AAGCCGGCCGAGCCGCCAGCATTGACAGG
p3	AAGCCGGCCGAACCGCCACCCTCAGAACC
p4	ACCGCCAGAGCCACCTCCGCC
p5	CGGAATTCTCAGCCGCCAGCATTGACAGG
p6	CTTTCAACAGTCTGTGCGGCCCC
p7	GGGGCCGCACAGACTGTTGAAAG
p8	AAACAGCTATGACCATG
p9	GTAAAACGACGGCCAGT

Para obtener el vector pKBJ1 (Tabla 2) se amplificaron mediante PCR los genes de los dominios I (DI) y II (DII) de la proteína III (pIII) del bacteriófago M13, a partir del plásmido pHEN2, utilizando los oligonucleótidos p1 y p2 (Tabla 3). El fragmento obtenido se digirió con *EagI* y se clonó en el vector pUC119-L36 digerido con *NotI*. El vector pKBJ2 se construyó mediante la amplificación por PCR de los genes de los dominios DI y DII de la pIII, a partir del plásmido pHEN2, utilizando los oligonucleótidos p4 y p5 (Tabla 3). El fragmento obtenido se digirió con *NotI*-*EcoRI* y se clonó en el vector pUC119-L36. El codón de parada ámbar situado entre el scFv y la pIII en el vector pHEN2, se eliminó mediante el uso del *kit Quick-Change* (Stratagene) y los oligonucleótidos p6 y p7.

Para obtener el vector pKBJ3 se amplificó mediante PCR el gen del dominio DI de la pIII, a partir del plásmido pHEN2, utilizando los oligonucleótidos p1 y p3. El fragmento obtenido se digirió con *EagI* y se clonó en el vector pUC119-L36, digerido con *NotI*. La secuencia de todas las construcciones se verificó usando los oligonucleótidos p4, p8 y p9. Los vectores pUC119-D4, pKBJ1-D4, pKBJ2-D4 y pKBJ3-D4 fueron cedidos por el Dr. Peter Kristensen (*Aarhus University*, Dinamarca).

### 3.1.2- Vectores de expresión en células eucariotas

Los vectores empleados y los vectores generados en este trabajo aparecen detallados en la Tabla 4. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla 5.

Tabla 4 Vectores de expresión en células eucariotas				
Vector	Vector de origen	Inserto	Características	Proveedor-Referencia
pCR3.1	-	-	Promotor CMV Resistencia a Neomicina/G418	Invitrogen
pCR3.1-L36	pCR3.1	scFv L36	Promotor CMV Péptido señal OncoM Resistencia a Neomicina/G418 Etiqueta 6His-myc	L. Álvarez-Vallina (148)
pCEP4	-	-		Invitrogen
pBEL2	pCEP4	scFv B1.8	Origen de replicación y gen EBNA-1 Promotor CMV Resistencia a Higromicina	L. Álvarez-Vallina (20)
pLAV39		scFv MFE-23		L. Álvarez-Vallina
pCR3.1-L36-DI	pCR3.1-L36	scFv L36-DI		Este trabajo
pCR3.1-L36-NC1 <sup>ES+</sup>		scFv L36-NC1 <sup>ES+</sup>		Este trabajo
pCR3.1-L36-linker-NC1 <sup>ES+</sup>		scFv L36-linker-NC1 <sup>ES+</sup>	Promotor CMV Péptido señal OncoM Resistencia a Neomicina/G418 Etiqueta 6His-myc	Este trabajo
pCR3.1-NC1		NC1 <sup>ES+</sup>		Este trabajo
pCR3.1-ES		ES		Este trabajo
pCR3.1-L36-linker-NC1 <sup>ES-</sup>		scFv L36-linker-NC1 <sup>ES-</sup>		Este trabajo
pBEL2-linker-NC1 <sup>ES-</sup>	pBEL2	scFv B1.8-linker-NC1 <sup>ES-</sup>	Promotor CMV Péptido señal OncoM Resistencia a higromicina Etiqueta 6His-myc	Este trabajo
pLAV39-linker-NC1 <sup>ES-</sup>	pLAV39	scFv MFE-23-linker-NC1 <sup>ES-</sup>		Este trabajo

Tabla 5 Oligonucleótidos utilizados para la generación de los vectores de expresión en eucariotas	
Número	Secuencia (5'-3')
e1	AGGTGCGGCCGCGGGGCCGCAACTGTTGA
e2	AAAATCTAGACCAGTGAATTCTTATTAATG
e3	TAGAAGGCACAGTCGAGG
e4	ATTCAGATCTTGGGCAGGTGAGGAT
e5	ATAGTTTAGCGGCCGCTTTGGAGAAAGAGGTCATGAA
e6	ATATAGCGCGGCCGCGAATTCAGATCTTGGGCAGGTGAGGAT
e7	TAGAAGGCACAGTCGAGG

e8	TCTGGCTCCAAGTCTGGC
e9	AATTCAGGCGCCGGTGGATCTGGTGGCTCCTCTGGCTCAGACGGAGCGTCGGGTTCGCGA
e10	GATCTCGGAACCCGACGCTCCGTCTGAGCCAGAGGAGCCACCAGATCCACCGGCGCCTG
e11	CGATGTCGGAACA
e12	GATCTGTTTCGCGACAT
e13	CCTAGATCTTGCTCATACTCATCAGGACTTTCAG
e14	GTCCTAGGTGCGGCCGCGAAT
e15	ATAGTTTAGCGGCCGCTCATTGCCCGTGCCTCTCAG

Para obtener el plásmido pCR3.1-L36-DI el gen del DI de la pIII se amplificó mediante PCR, a partir del vector pKBJ3, utilizando los oligonucleótidos e1 y e2 (Tabla 5). El fragmento obtenido se digirió con NotI-XbaI y se clonó en el vector pCR3.1-L36. La secuencia se verificó, usando el oligonucleótido e3. La región carboxiterminal NC1 (del inglés *noncollagenous domain 1*) del colágeno XVIII murino se amplificó mediante PCR a partir del clon mc3b (123), cedido por el Dr. Bjorn R. Olsen (*Harvard Medical School*, Boston, EE.UU.), utilizando los oligonucleótidos e4 y e5 (Tabla 5). El producto de PCR se reamplificó utilizando los oligonucleótidos e5 y e6, se digirió con NotI y se clonó en el vector pCR3.1-L36 digerido con la misma enzima, obteniendo así el plásmido pCR3.1-L36-NC1<sup>ES+</sup>. El vector pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES+</sup> se obtuvo insertando entre los sitios EcoRI-BglII del vector pCR3.1-L36-NC1<sup>ES+</sup> una pareja de oligonucleótidos alineados (e9 y e10), que contienen un espaciador peptídico flexible (*linker*). Para obtener el vector pCR3.1-NC1 se eliminó el fragmento ClaI-BglII del vector pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES+</sup> y se insertó en su lugar una pareja de oligonucleótidos alineados (e11 y e12), que contienen un sitio de restricción NruI.

El vector pCR3.1-ES se obtuvo mediante la amplificación por PCR del gen de la endostatina (ES), a partir del vector pCR3.1-NC1, utilizando los oligonucleótidos e5 y e13 (Tabla 5). El producto de PCR se digirió con BglII y NotI y se clonó en el vector pCR3.1-NC1. El plásmido pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES-</sup> se construyó mediante la amplificación por PCR del *linker* y del subdominio de trimerización del dominio NC1, a partir del vector pCR3.1-NC1, utilizando los oligonucleótidos e14 y e15 (Tabla 5). El fragmento obtenido se digirió con NotI y se clonó en el vector pCR3.1-L36. La secuencia de los plásmidos se verificó utilizando los oligonucleótidos e7 y e8.

Para obtener los vectores pBEL2-linker-NC1<sup>ES-</sup> y pLAV39-linker-NC1<sup>ES-</sup>, los plásmidos pBEL2, que contiene el gen del AcMo B1.8 en formato scFv, y pLAV39 que contiene el gen del AcMo MFE-23 en formato scFv, se digirieron con NotI, se trataron con fosfatasa alcalina y se introdujo el fragmento NotI-NotI del vector pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES-</sup>, que contiene un *linker* y del subdominio de trimerización del dominio NC1.

#### 4- TRANSFECCIONES

Las líneas celulares HEK-293 y B16F10 se transfectaron con Lipofectamine Plus Reagent según las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Para la obtención de transfectantes estables, las células HEK-293 se seleccionaron en DMEM-C suplementado con 0,5 mg/ml de neomicina (G418) (Promega) o con 100 µg/ml de higromicina B (Invitrogen). Las células B16F10 se seleccionaron en medio suplementado con 3 mg/ml de G418.

#### 5- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para la expresión de Acs recombinantes se transformaron bacterias *E. coli* TG1 con los plásmidos pHEN2, pKBJ1, pKBJ2 o pKBJ3. Se cultivaron colonias individualizadas de bacterias transformadas en medio 2xTY, suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 0,1% de glucosa, en agitación durante 4 horas a 37 °C. Entonces se añadió isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG) (1 mM) y el cultivo continuó en agitación durante 16 horas a 22 °C. Los AcRs se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo bacteriano (72) mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC, HisTrap HP, GE Healthcare).

Para la expresión y posterior purificación de proteínas recombinantes a partir de medio condicionado de células eucariotas, se obtuvieron transfectantes estables en células HEK-293. Las células se cultivaron en DMEM-L y el medio condicionado libre de suero (MCLS) fue recogido, centrifugado y filtrado (0,45 µm). Posteriormente, las proteínas recombinantes se purificaron por IMAC. Las proteínas recombinantes que contenían el dominio ES (ES, NC1 y L36-linker-NC1<sup>ES+</sup>) se sometieron a un paso de purificación adicional mediante columnas de Heparina (HiTrap Heparin HP, GE Healthcare). Las proteínas que contenían el scFv L36 (L36), L36-linker-NC1<sup>ES-</sup> (L36-NC1<sup>ES-</sup>) y L36-linker-NC1<sup>ES+</sup> (L36-NC1<sup>ES+</sup>) se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas de proteína A (HiTrap protein A HP, GE Healthcare).

Las proteínas purificadas se dializaron frente a PBS y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Todas las proteínas recombinantes se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y mediante ELISA.

#### 6- ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS EN FASE SÓLIDA (ELISA)

##### 6.1- Elisa para la detección de anticuerpos funcionales

La laminina-1 (LM-111) murina se obtuvo de BD Biosciences y el CEA humano y la fibronectina humana (FN) de Sigma-Aldrich. Para la generación de conjugados de seroalbúmina bovina (BSA) con el hapteno 4-hidroxi, 3-nitro, 5-iodofenilacetil (hapteno NIP) (Sigma-Aldrich) en una relación molar 10:1 (NIP<sub>10</sub>-BSA) se siguió un protocolo anteriormente descrito



(134). Los Ags se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc). El AcMo anti-c-myc, clon 9E10, así como el Ac de conejo anti-BSA se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El Ac de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP se obtuvo de Amersham. Abcam proporcionó los Acs de conejo anti-IgG de ratón (anti-IgG1, anti-IgG2a y anti-IgG total), y Dako el Ac de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP.

Tabla 6		Protocolo de ELISA para la detección de anticuerpos			
Objeto de estudio	Detección de Acs anti-FN	Detección de Acs anti-LM-111	Detección de Acs anti-NIP	Detección de Acs anti-CEA	Detección de AcBis anti-LM-111 x anti-NIP
Ag inmovilizado (100 µl/pocillo)	FN (10 µg/ml)	LM-111 (10 µg/ml)	NIP <sub>10</sub> -BSA (10 µg/ml)	CEA (2 µg/ml)	LM-111 (10 µg/ml)
Inmovilización	16 horas a 4 °C				
Lavado	PBS (x3)				
Solución de bloqueo (37° C)	PBS-5% BSA				PBS-5 % LPD <sup>1</sup>
Muestra de estudio (100 µl/pocillo)	Medio condicionado o AcMos purificados (5 µg/ml)				Medio condicionado o AcMos purificados (5 µg/ml), posteriormente NIP <sub>10</sub> -BSA (10 µg/ml)
Lavado	PBS-0,05 % Tween <sub>20</sub> (x3) + PBS (x3)				
Ac Primario (100 µl/pocillo)	AcMo anti-myc (1 µg/ml)				Ac de conejo anti-BSA (2 µg/ml)
Lavado	PBS-0,05 % Tween <sub>20</sub> (x3)				
Ac Secundario conjugado con HRP (100 µl/pocillo)	Ac de cabra anti-IgG de ratón (1/1000)				Ac de cabra anti-IgG de conejo (1/1000)
Lavado	PBS-0,05 % Tween <sub>20</sub> (x3) + PBS (x3)				
Reacción colorimétrica (100 µl/pocillo)	TMB <sup>2</sup>				
Lectura DO	450 <sub>nm</sub> -570 <sub>nm</sub>				

<sup>1</sup>LPD: Leche en polvo desnatada

<sup>2</sup>TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (Sustrato Cromogénico)

## 6.2- Elisa para la detección de anticuerpos circulantes

Los AcRs L36 o B1.8, se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos Maxisorp mediante una incubación de 16 horas a 4 °C en PBS (10 µg/ml). Posteriormente las placas se lavaron con PBS, se bloquearon con PBS-3% BSA durante 30 minutos a 37 °C y se añadieron los sueros diluidos con PBS-3% BSA, incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente. La presencia

de IgGs de ratón unidos a los Acs recombinantes se detectaron con los Acs policlonales de conejo anti-IgG1, anti-IgG2a, y anti-IgG total, y posteriormente con un Ac de cabra anti-IgG de conejo (1/5000) conjugado con HRP.

### **6.3- Elisa para la detección y cuantificación de citoquinas**

Los esplenocitos procedentes de ratones BALB/c inmunizados o no inmunizados se cultivaron por triplicado en placas de 96 pocillos ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) de fondo redondo (Falcon, BD Biosciences) con 0,2 ml de RPMI-C, en presencia de AcR purificado (L36 o B1.8; 7,5  $\mu$ g/ml), o ionomicina (1  $\mu$ g/ml) y phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (10 ng/ml). Tras 72 horas de incubación a 37 °C, se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la secreción de Interleuquina-4 (IL-4) y de Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) mediante ELISA con un *kit* comercial (Endogen).

## **7- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA**

### **7.1- Estudios estructurales**

#### **7.1.1- Cromatografía analítica de filtración en gel**

Los análisis se realizaron utilizando columnas Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare) equilibradas con PBS (pH 7,4) en un equipo ÄKTA FPLC (GE Healthcare). La columna se calibró con marcadores de peso molecular que comprendían desde 16 kDa hasta 655 kDa (GE Healthcare). El azul dextrano se utilizó como volumen de exclusión. Las muestras (100  $\mu$ l) de proteínas recombinantes purificadas (0,5-1,0 mg/ml), se inyectaron en la columna y se eluyeron (velocidad de flujo de 0,5 ml/minuto).

#### **7.1.2- Ultracentrifugación analítica por velocidad de sedimentación**

Los estudios de ultracentrifugación se realizaron a 20 °C en una ultracentrífuga analítica Optima XL-A (Beckman Coulter), equipada con sistema óptico UV-VIS, para la detección de la concentración de solutos. Se realizaron ensayos de equilibrio de sedimentación a baja velocidad en columnas cortas (23  $\mu$ l) y con tres velocidades sucesivas (5.000, 6.000 y 11.000 rpm), las lecturas de equilibrio se tomaron a las 20 h a una longitud de onda de 280<sub>nm</sub>. La señal basal se determinó tras centrifugación a alta velocidad (5 h a 42.000 rpm). El peso molecular medio se obtuvo con el programa EQASSOC (112). Los ensayos de velocidad de sedimentación se realizaron a 42.000 rpm, medido a 280<sub>nm</sub>. Los perfiles de velocidad de sedimentación se analizaron mediante el modelado global de los frentes de sedimentación a la ecuación de transporte de Lamm (154), de acuerdo con los procedimientos numéricos implementados en el programa SEDFIT; este análisis permitió calcular las correspondientes distribuciones de

coeficiente de sedimentación (102). Estos valores fueron corregidos a condiciones estándar (20 °C y agua, denominado s20w) usando el programa SEDNTERP (102). El posterior análisis hidrodinámico, para hallar el coeficiente de distribución, se realizó mediante el programa SEDFIT (154).

## **7.2- Ensayos de proteólisis y estabilidad *in vitro***

### **7.2.1- Procesamiento proteolítico**

Para los estudios de proteólisis se emplearon las proteasas de la matriz extracelular (MMPs, del inglés *Matrix Metalloprotease*) de origen humano MMP-1 y MMP-9 (Oncogene Research Products), MMP-3, MMP-8, y MMP-14 (MT1-MMP) (Calbiochem), así como la cathepsina L humana y la elastasa pancreática porcina (Calbiochem). Las proteínas recombinantes purificadas (0,6 µM) se incubaron durante 10 minutos a 37 °C con cada una de las MMPs (25 nM, en una solución 50 mM Tris-HCl; pH 7,5; 50 mM CaCl<sub>2</sub>; 150 mM NaCl; 50 µM ZnSO<sub>4</sub>; 0,05 % Brij-35), cathepsina L (10 nM en una solución 50 mM CH<sub>3</sub>COONa; pH 5,5; 5mM EDTA; 2mM ditiotretitol) o elastasa (25 nM en una solución 50 mM CH<sub>3</sub>COONa; pH 6,0). Las alícuotas se analizaron mediante ELISA y mediante SDS-PAGE al 12 % y transferencia *Western*.

### **7.2.2- Ensayos de estabilidad**

Para los ensayos de estabilidad en suero las proteínas recombinantes purificadas (500 ng) se incubaron a 37 °C, durante 3, 24, 48 y 72 horas con 12,5% de suero humano o murino. Para los ensayos de estabilidad en presencia de proteasas específicas presentes en MCLS de células tumorales, las proteínas purificadas (2 µg) se incubaron a 37 °C, durante 48 horas en las condiciones antes indicadas. Las alícuotas se analizaron mediante ELISA y mediante SDS-PAGE al 12% y transferencia *Western*.

## **7.3- Estudios de afinidad mediante resonancia de plasmón superficial**

Todos los estudios de afinidad mediante resonancia de plasmón superficial (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*) se realizaron a temperatura ambiente utilizando un sistema Biacore 3000 (GE Healthcare). Se utilizaron *chips* sensores de dextrano carboximetilado (CM5) y tampón HBS-EP (0,01 M HEPES; pH 7,4; 0,15 M NaCl; 3 mM EDTA; 0,005% Surfactante P<sub>20</sub>) previamente filtrado por 0,22 µm y desgasificado. Los Ags (NIP<sub>10</sub>-BSA y BSA) se diluyeron en una solución CH<sub>3</sub>COONa 10 mM (pH 4,5) y se inmovilizaron sobre el *chip* siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). El Ag NIP<sub>10</sub>-BSA se inmovilizó a 100, 1800 y 8500 unidades de resonancia (RU) y el Ag BSA, utilizado como control negativo de la interacción, se inmovilizó a 1900 RU.

La especificidad de la unión se determinó mediante la inyección, a una velocidad de flujo de 50  $\mu\text{l}/\text{minuto}$ , de MCLS de células 293T transfectadas con un vector vacío o con un vector que codificaba los AcRs B1.8 o L36, tanto en formato scFv, como en formato trimérico. Tras cada experimento las superficies se regeneraron con dos pulsos de una solución HCl 30 mM, permitiendo la vuelta de las señales de resonancia a niveles basales. Los ensayos cinéticos se realizaron en un *chip* con 100 RU. Muestras individuales de AcRs B1.8 (scFv o trimérico) purificados se inyectaron a una velocidad de flujo de 20  $\mu\text{l}/\text{minuto}$  para la medición de las velocidades de asociación/disociación. Los cambios en el índice de refracción se eliminaron mediante la sustracción de las respuestas de los *chips* de referencia y la respuesta media de un control negativo se restó a todos los sensogramas. Los resultados cinéticos se obtuvieron utilizando el software BIAevaluation v4.1 ajustando las curvas de unión a un modelo de interacción de Langmuir 1:1 simple ( $A+B=AB$ ).

## 8- MODELADO COMPARATIVO DE PROTEÍNAS

Para el modelado por homología del AcR L36 en formato scFv (46), se utilizó la estructura 2GHW.B obtenida del *Protein Data Bank* (PDB) (17). La estructura del subdominio de trimerización del colágeno XVIII murino fue obtenido a partir de *ModBase* (127). Ambos dominios se encuentran unidos por un *linker* de 21 aminoácidos para formar un monómero del AcR L36 en formato trimérico. Las coordenadas de los monómeros restantes se obtuvieron mediante la aplicación de un eje triple de simetría de rotación. El modelo trimérico del L36 se formó mediante la suma de las coordenadas de los tres monómeros. La estructura fue optimizada con *GROMACS* (166) y su energía evaluada con *DFIRE* (179). Con el objetivo de comparar los valores de *DFIRE* entre el monómero y el trímero, las energías fueron normalizadas dividiéndolas por la longitud de la secuencia.

## 9- CONJUGACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES CON CIANINA 5

Los Acs se conjugaron con el fluorocromo Cianina 5 (Cy5) siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). Los AcRs purificados (1 mg/ml) se dializaron frente a un tampón PBS-100 mM NaCl (pH 7,4). La reacción de marcaje se realizó a temperatura ambiente durante 30 minutos, añadiendo 200  $\mu\text{l}$  de una solución de Cy5 (2 mg/ml) en dimetilsulfóxido (DMSO). Las moléculas de Cy5 no unidas se eliminaron mediante cromatografía de exclusión en Sephadex G25-M (GE Healthcare). El cociente molar proteína: Cy5 (P/Cy5), calculado según el procedimiento descrito por Birchler *et al.* (18), fue de 1:1,4 a 1:1,8.

## 10- CITOMETRÍA DE FLUJO

### 10.1- Expresión de antígenos en la superficie celular

La expresión de CD66 (CEA) en las líneas tumorales HeLa, HeLa<sup>CEA</sup> se estudio por inmunofluorescencia indirecta usando el AcMo anti-CEA humano, clon NCRC23 (AbD Serotec), y un segundo Ac de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Isotiocianato de fluoresceína). La unión de Acs recombinantes derivados del clon MFE-23 a la superficie celular se estudió por inmunofluorescencia indirecta incubando células HeLa y HeLa<sup>CEA</sup> con el AcR purificado, el AcMo 9E10, y un Ac de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC. Las células muertas se excluyeron del análisis utilizando ioduro de propidio (5 µg/ml). Los estudios se realizaron en un citómetro EPICS XL (Coulter Electronics).

### 10.2- Cuantificación de citoquinas circulantes

Los niveles de citoquinas circulantes (INF- $\gamma$  e IL-4) en el suero de los ratones BALB/c, previamente inmunizados, se determinaron con un *kit* de detección (Bender MedSystems). Los estudios se realizaron en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences) y el análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando el programa informático BMS-FPS (Bender MedSystems).

## 11- TRANSFERENCIA *WESTERN*

Las muestras de medio condicionado o proteína purificada (1 µg) se analizaron mediante SDS-PAGE al 12%. A continuación las proteínas fueron transferidas por *electroblotting* a una membrana de PVDF (Immobilon-P Tansfer Membrane 0,45 µm, Millipore). La membrana fue bloqueada con PBS-0,05% Tween<sub>20</sub>-5% leche en polvo desnatada (LPD), durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas que presentaban una etiqueta peptídica *myc*, se detectaron con el AcMo anti-*myc* (1 µg/ml) de un diluido en PBS-5% LPD durante 1 hora. La proteínas que contienen ES, se detectaron con un AcMo anti-ES, clon 1837.46 (Upstate Biotechnology) (1 µg/ml). En ambos casos y, tras varios lavados con PBS-0,05% Tween<sub>20</sub>, se incubó la membrana con un Ac de oveja anti-IgG de ratón (1/8000) conjugado con HRP (Amersahm). Tras lavar la membrana con PBS las bandas se visualizaron mediante un sistema de detección por quimioluminiscencia (GE Healthcare).

## 12- ESTUDIOS FUNCIONALES

### 12.1- Ensayos de proliferación celular

Para los ensayos de proliferación con líneas celulares se empleó una técnica colorimétrica rápida que utiliza el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

(MTT), que es reducido por deshidrogenasa mitocondriales de las células viables a formazan púrpura. Las células ( $5 \times 10^4$  células/pocillo) se incubaron por duplicado bajo diferentes condiciones, en placas de 96 pocillos. A las 24, 48 y 72 horas se determinó la proliferación celular, siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega).

## 12.2- Ensayos de migración celular

Para los ensayos de migración se usaron cámaras *transwell* con filtro de poro de 8mm de diámetro (Falcon, BD Biosciences) cubiertos con una preparación (1,25 µg/ml) de matriz extracelular (MEC) de uso comercial (Matrigel™ BM Matriz, BD Biosciences). En la cámara superior se añadieron células HUVEC ( $10^5$ ) en medio libre de suero o en presencia de proteínas (L36, L36-linker-NC1<sup>ES+</sup> o ES) purificadas (20 µg/ml). En la parte inferior se añadieron 600 µl de medio completo. Tras 16 horas, las células que no habían migrado se retiraron de la parte superior de los insertos y las células migradas se fijaron mediante el lavado de los filtros con PBS y 1% glutaraldehído, durante 20 minutos. Tras dos lavados adicionales se tiñeron con 0,1% cristal violeta durante 20 minutos. Tras el lavado del filtro se procede a su separación del transwell y montaje en portas con medio de montaje. Se realizó la cuantificación celular en cuatro campos visuales al azar.

## 12.3- Ensayos de angiogénesis *in vitro*

Los ensayos de formación de estructuras tubulares o capilariformes (CLS, del inglés *capillary-like structure*) *in vitro* por HUVEC, fueron realizados según el protocolo descrito por Sanz *et al.* (149). Brevemente, microplacas de Terasaki (Nunc) fueron tapizadas con 2 µl de Matrigel™ y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C para su gelidificación. Las Células endoteliales ( $1,5 \times 10^3$ ) se sembraron sobre la capa de Matrigel™, y se incubaron durante 16 horas a 37 °C en presencia de diferentes proteínas purificadas. La proteína Fc-ES purificada fue proporcionada por el Dr. Kashi Javaherian (*Harvard Medical School*, Boston, EE.UU). El estudio del grado de formación de estructuras CLS se realizó mediante el análisis de las imágenes digitales (almacenadas como archivos BMP de 328x256 píxeles en una escala de grises de 8-bits.), obtenidas en un microscopio Axiovert 100 (Carl Zeiss) equipado con una cámara SPOT (Diagnostics Instruments), utilizando el programa Angiodraw (149).

## 13- ESTUDIOS *in vivo*

Los protocolos utilizados para la manipulación de animales, que a continuación se detallan han sido aprobados por el Comité de Ética Animal del Hospital Universitario Puerta de Hierro.

### 13.1- Anestesia

Los ratones utilizados en este trabajo se anestesiaron por vía inhalatoria con isofluorano (Abbott Laboratories) vaporizado en oxígeno y se mantuvieron en ambiente estéril para la realización de los protocolos de implantación subcutánea (s.c.) de tumores, administración por vía i.m. e i.v., sangrados retroorbitales, y el sacrificio de los mismos. Tras la anestesia inhalatoria se indujo anestesia a largo plazo para la realización de los ensayos de imagen molecular, mediante la inyección s.c. de una solución salina con ketamina (97,5 µg/g de peso), atropina (8 ng/g de peso) y diazepam (7,5 µg/g de peso).

### 13.2- Inmunizaciones

Para los estudios de vacunación se utilizaron ratones hembra de seis semanas de edad de la línea BALB/c (Harlan Ibérica). Los ratones se sometieron a un proceso de inmunización seriada (161) con PBS (n = 4) o el AcR L36 en formato scFv purificado (n = 4) con adyuvante incompleto de Freund (IFA). Se administraron dos inyecciones vía i.p. a día 0 y 14. Dos grupos de ratones (n = 4) recibieron inyecciones i.m. de 50 µg de ADN plasmídico (pCR3.1-L36 o pCR3.1-L36-DI) a día 0, 7, 14 y 21. Las muestras de sangre se extrajeron mediante sangrado retroorbital los días 14, 28 y 42.

### 13.3- Ensayos de implantación tumoral

En estos estudios se utilizaron ratones hembra de seis semanas de edad de la línea C57BL/6 (Harlan Ibérica). Las células B16F10 ( $1-2 \times 10^6$  por animal) sin transfectar o transfectadas se implantaron vía s.c. en la zona dorsal. Los tumores se midieron cada dos días y el volumen tumoral se determinó según la fórmula: ancho<sup>2</sup> x largo x 0,52 (tomándose la medida más pequeña como ancho). El análisis estadístico de las medidas de crecimiento tumoral entre los diferentes grupos se realizó mediante análisis paramétrico utilizando la prueba *t-Student*. El nivel de significación estadística se situó en  $p \leq 0,05$ .

### 13.4- Ensayos de imagen molecular con anticuerpos recombinantes multivalentes

En estos estudios se utilizaron ratones hembra atímicos desnudos nu/nu de 6 semanas (Harlan Ibérica). Las células HT1080, MKN45 o HeLa ( $2 \times 10^6$ ) se implantaron vía s.c. en la región dorsal. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño apropiado (0,2-0,4 cm<sup>3</sup>) se administraron por i.v. 100 µl de una solución de AcR recombinante purificado (1 mg/ml), en formato scFv o en formato trimérico marcado con Cy5. Las imágenes de fluorescencia *in vivo* se tomaron a las 3, 24 y 48 horas después de su administración i.v. del AcR marcado, con un sistema Hamamatsu dotado de una cámara digital de alta resolución con dispositivos de cargas

acopladas (CCD) ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics). Para el análisis y procesamiento de las imágenes se empleó el software Wasabi (Hamamatsu Photonics).

Para un ensayo típico se toma primero una imagen con luz visible y un tiempo de exposición de 20 milisegundos la imagen se recoge con una ganancia media y un agrupamiento de píxeles (*binning*) en formato de 1x1. A continuación, se realiza la toma de imagen de fluorescencia excitando el fluorocromo con luz polarizada a 649<sub>nm</sub> y un tiempo de exposición de 1 segundo. Por último la imagen se recoge con una ganancia media y un agrupamiento de píxeles en formato de 2x2. El procesamiento incluye una sustracción de la señal residual (eliminación de la autofluorescencia) y una coloración a escala siguiendo un perfil de intensidad de señal. Por último se mezclan las imágenes para obtener la composición final. Para la cuantificación de la señal las regiones de interés son acotadas y la intensidad media de luz (intensidad total/superficie) es cuantificada y registrada. En todas las representaciones gráficas se muestran las medias de las intensidades y el error estándar del grupo.

## 14- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Las muestras tumorales procedentes de ratones sacrificados se extrajeron, se fijaron con formalina y se embebieron en parafina. Los cortes histológicos procedentes de cada tumor se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se visualizaron (x5) para identificar estructuras vasculares. Las áreas de alta densidad (*vascular "hot spots"*) se analizaron con mayor aumento (x40) y se contaron los vasos maduros en seis campos visuales, elegidos al azar (169).



## RESULTADOS

“Una lúgubre noche de noviembre vi coronados mis esfuerzos. Con una ansiedad casi rayana en la agonía, reuní a mi alrededor los instrumentos capaces de infundir la chispa vital al ser inerte que yacía ante mí. Era ya la una de la madrugada; la lluvia golpeteaba triste contra los cristales, y la vela estaba a punto de consumirse, cuando, al parpadeo de la llama medio extinguida, vi abrirse los ojos amarillentos y apagados de la criatura; respiró con dificultad y un movimiento convulso agitó sus miembros.”

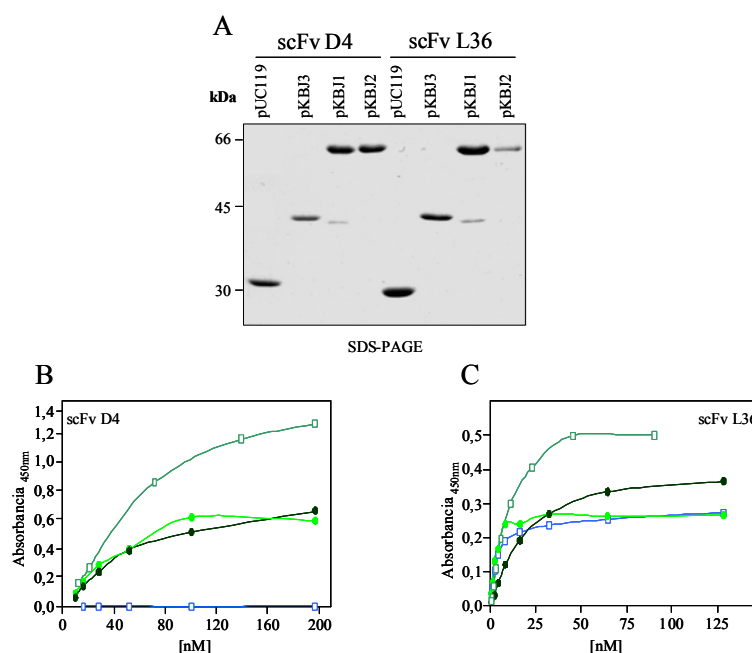
Frankenstein o el moderno Prometeo  
*Frankenstein or the Modern Prometheus*  
(Mary W. Shelley)



está situada entre el scFv y los dominios DI y DII; y el plásmido pKBJ3, que contiene el scFv, el dominio DI y la etiqueta peptídica 6His-myc, en el extremo carboxiterminal.

## 1.2- Caracterización estructural y funcional

Los scFvs y las distintas proteínas de fusión scFv-pIII se purificaron desde extractos periplásmicos de la cepa de *E. coli* TG1, mediante IMAC. Como se observa en la Figura 9A, el grado de pureza de las proteínas recombinantes purificadas fue muy alto y los pesos moleculares observados corresponden a los pesos teóricos: de 39,3 y 38,5 kDa, para las proteínas de fusión scFv-DI (pKBJ3); y de 61,4 y 63,9 kDa, para las proteínas de fusión scFv-DI-DII-6His-myc (pKBJ1) y L36-6His-myc-DI-DII (pKBJ2) (datos para L36 y D4, respectivamente). El nivel de proteína L36-6His-myc-DI-DII purificada fue significativamente más bajo (1,5 µg/µl) que el de las otras proteínas de fusión (3 µg/µl). Además, en ambos AcRs, se observó cierto grado de proteólisis espontánea tras la purificación de la proteína scFv-DI-DII-6His-myc, con pérdida del dominio DII y de la etiqueta 6His-myc (Figura 9A).



**Figura 9.** (A) Determinación mediante SDS-PAGE de los AcRs derivados de D4 y L36 purificados a partir de extractos periplásmicos. (B) Análisis funcional, mediante ELISA, de la interacción entre las diferentes proteínas derivadas del AcR D4 (B) o del AcR L36 (C) con fibronectina (B) o laminina (C) inmovilizada sobre plástico. □ pUC119 ● pKBJ1 ● pKBJ2 □ pKBJ3.

Los estudios funcionales, realizados mediante ELISA, demuestran que el AcR D4, que no es activo como scFv aislado, recupera su funcionalidad tras la fusión con dominios (DI o DI-II) derivados de la pIII del bacteriófago (Figura 9A). Esto indica que es posible rescatar funcionalmente un AcR inactivo cuando se expresa en el mismo contexto molecular en el cual ha sido seleccionado. La fusión en el extremo carboxiterminal del scFv L36, del dominio DI o de los dominios DI-II de la pIII, no altera las propiedades fisicoquímicas del AcR. Las proteínas

de fusión que contienen ambos dominios de la pIII, L36-DI-DII-6His-myc y L36-6His-myc-DI-DII, tienen un comportamiento similar al de scFv aislado (Figura 9C). Sin embargo, la proteína de fusión que incorpora únicamente el DI presenta una actividad de unión superior a la del scFv no modificado y a las proteínas de fusión que contienen los dos dominios.

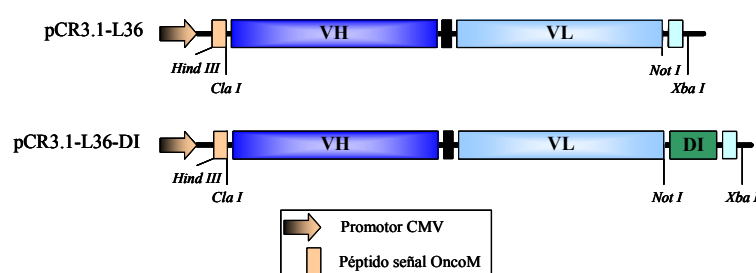
Para comprobar si existía una correspondencia directa entre funcionalidad y grado de multimerización, éste se valoró mediante cromatografía de filtración en gel en preparaciones frescas de proteínas purificadas. Como se indica en la Tabla 7, el scFv L36 se presenta mayoritariamente en forma monomérica (93%), mientras que las preparaciones que contienen dominios de la pIII son más heterogéneas. En la preparación de L36-DI-DII-6His-myc predominan los monómeros (60%), mientras que en la preparación de L36-DI predominan los multímeros (68%). Respecto a la proteína de fusión L36-6His-myc-DI-DII, indicar que eluyó junto con el volumen de exclusión (500 kDa), imposibilitando la determinación de su multimerización.

**TABLA 7** Multimerización del scFv L36 y sus construcciones derivadas

Vector	Construcción	Monómero	Dímero	Multímero
pUC119	scFv-6His-myc	93%	7%	0%
pKBJ1	scFv-DI-DII-6His-myc	60%	14%	25%
pKBJ2	scFv-6His-myc-DI-DII	-	-	-
pKBJ3	scFv-DI-6His-myc	30%	2%	68%

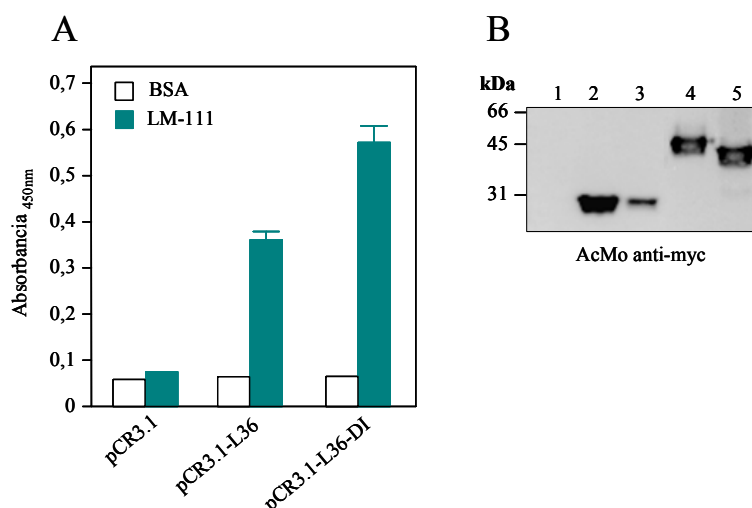
### 1.3- Diseño de una construcción génica para la expresión de un scFv como proteína de fusión con el dominio DI de la proteína pIII en células eucarióticas

Una vez demostrada la capacidad del dominio DI para inducir la multimerización y mejorar las propiedades de unión del scFv L36, se construyó el plásmido pCR3.1-L36-DI que contiene, bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV), la secuencia del péptido señal oncostatina M (OncoM), los genes del AcR L36, con formato scFv, unidos al dominio DI de la pIII y las etiquetas peptídicas 6His-myc para su detección y/o purificación (Figura 10). Como control se utilizó el plásmido pCR3.1-L36, que contiene los genes del scFv L36



**Figura 10.** Representación esquemática de las construcciones génicas derivadas del AcR L36 en formato scFv pCR3.1-L36) y scFv-DI (pCR3.1-L36-DI).

Ambos plásmidos se transfectaron en células humanas (células 293T) y a las 48 horas se midieron los niveles de AcR funcional mediante ELISA. En el sobrenadante de las células transfectadas con el plásmido vacío (pCR3.1) no se detectó actividad funcional, mientras que en el sobrenadante de las células transfectadas con el plásmido pCR3.1-L36, o con el plásmido pCR3.1-L36-DI, se detectó la presencia de AcR específico en forma funcional (Figura 11A). La señal fue más alta con el plásmido pCR3.1-L36-DI que con el pCR3.1-L36. Las características bioquímicas de ambas moléculas se analizaron mediante transferencia *Western* (Figura 11B). Es interesante destacar que, mientras que el scFv L36 secretado por células humanas y el purificado a partir de periplasma bacteriano tenían idéntico tamaño, la proteína de fusión scFv-L36-DI secretada por células 293T mostró un tamaño molecular ligeramente superior al purificado a partir de periplasma bacteriano, esto podría ser debido a las diferencia en el patrón de glicosilación en modelos procarióticos y eucarióticos. De hecho, el dominio DI presenta un sitio potencial de glicosilación (residuos 57-60) (69).

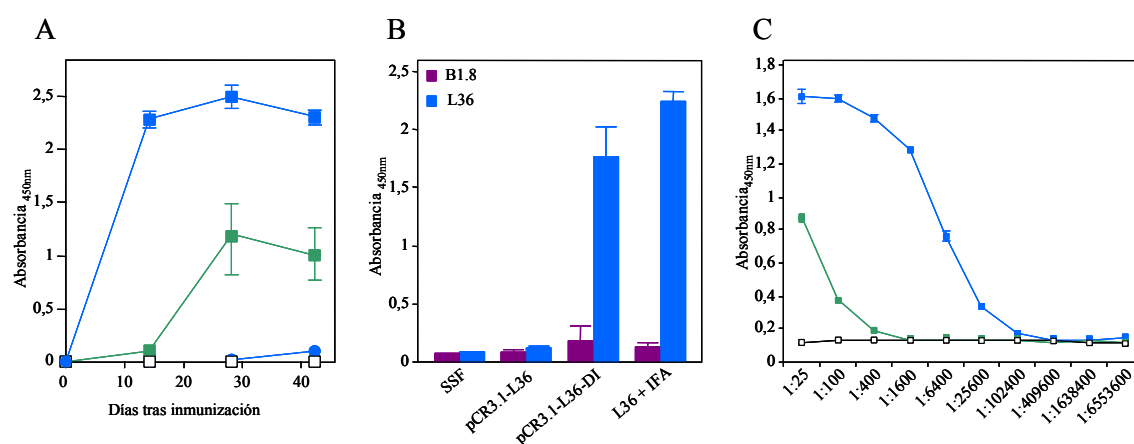


**Figura 11.** (A) Análisis funcional, mediante ELISA, de la interacción entre los AcRs presentes en el sobrenadante de células 293T transfectadas con el vector vacío (pCR3.1), con el vector pCR3.1-L36, o con el vector pCR3.1-L36-DI, con BSA o laminina. (B) Análisis mediante transferencia *Western* de los AcRs secretados por células 293T transfectadas con el vector pCR3.1 (1), con el vector pCR3.1-L36 (2), o con el vector pCR3.1-L36-DI (4). Como control se utilizaron los AcRs purificados a partir de sobrenadante bacteriano, scFv L36 (3) y scFv L36-DI (5).

#### 1.4- Estudio de la respuesta inmune humoral y celular frente al scFv L36 y a la proteína de fusión scFv L36-DI

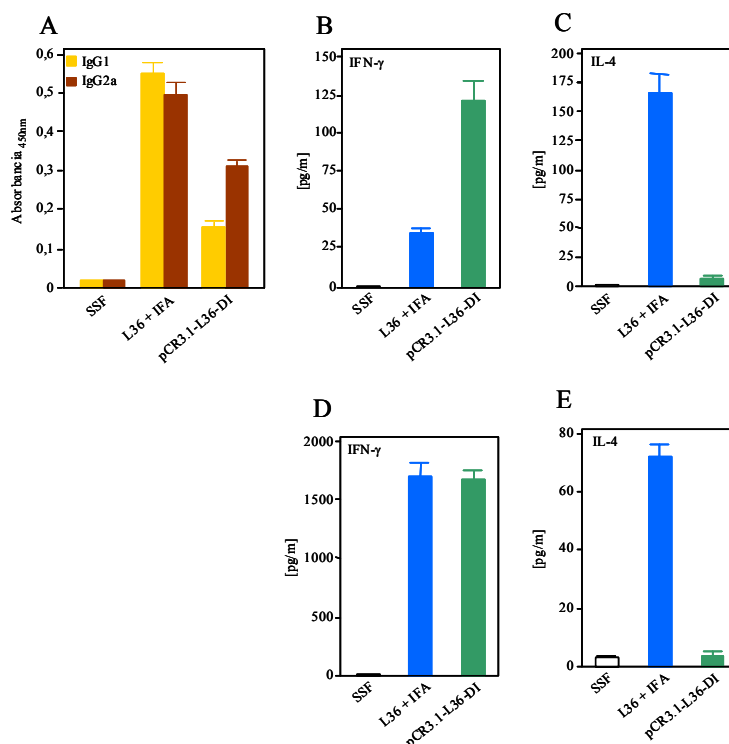
Con el objetivo de estudiar la inducción de respuestas inmunes, grupos de ratones BALB/c se sometieron a un proceso de inmunización seriada con ADN plasmídico (pCR3.1-L36 o pCR3.1-L36-DI) desnudo por vía i.m. Como controles se utilizaron suero salino fisiológico (SSF) (0,9% NaCl) y el scFv L36 purificado con IFA.

Se estudió la presencia de Acs IgG anti-L36 en sueros obtenidos en distintos momentos del calendario de vacunación. El grupo de ratones que recibió el L36 purificado en presencia de IFA desarrolló una respuesta específica, con niveles elevados de Acs IgG a día 14, manteniéndose a días 28 y 42 (Figura 12A). El grupo inmunizado con el plásmido pCR3.1-L36-DI también desarrolló una respuesta específica, aunque más tardía. Se detectaron niveles apreciables de Acs anti-L36 a día 28, tras la tercera inmunización (Figura 12A). Por el contrario, en el grupo inmunizado con el plásmido pCR3.1-L36 no se observó respuesta humoral IgG. Los Acs IgG inducidos mediante la inmunización con el scFv purificado o el plásmido pCR3.1-L36-DI no mostraron reactividad frente a un scFv (anti- hapteno NIP, B1.8) no relacionado (Figura 12B).



**Figura 12.** (A) Estudio, mediante ELISA, de la respuesta inmune en ratones BALB/c tras la inmunización con el plásmido pCR3.1-L36 (●) o pCR3.1-L36-DI (■); con suero salino fisiológico (SSF) (□); o con el scFv L36 purificado más el adyuvante incompleto de Freund (L36 + IFA) (■). Las determinaciones se realizaron a días 0, 14, 28 y 42. (B) Estudio, mediante ELISA, de la especificidad de la respuesta, en los ratones BALB/c inmunizados, en la detección del scFv L36 o de un scFv irrelevante B1.8. (C) Titulación de los sueros obtenidos a día 42 tras la inmunización de los ratones BALB/c con el vector pCR3.1-L36-DI (■), L36 + IFA (■), o SSF (□).

Centrando el estudio a los grupos en los que se detectó respuesta humoral específica, se procedió a la titulación de los sueros obtenidos a día 42 (Figura 12C). El título fue significativamente más alto en el grupo inmunizado con L36 purificado en presencia de IFA, que en el grupo que recibió ADN plasmídico (pCR3.1-L36-DI). Las máximas diluciones en las que los sueros eran positivos fueron 1:102.400 y 1:400, respectivamente. En la Figura 13A se muestran los niveles de IgG1 e IgG2a obtenidos en los mismos grupos de ratones. En el grupo inmunizado con scFv emulsionado con IFA, se detectaron cantidades similares de ambas subclases IgG1 e IgG2a, mientras que el grupo inmunizado con el plásmido pCR3.1-L36-DI predominaba la subclase IgG2a.



**Figura 13.** Determinación del tipo de respuesta (A) y cuantificación de la secreción de citoquinas (B y C) presentes en el suero de ratones BALB/c inmunizados con el plásmido pCR3.1-L36-DI, L36 purificado + IFA, o SSF. Determinación de la concentración de las citoquinas IFN- $\gamma$  (D) e IL-4 (E) en el medio de cultivo de esplenocitos, aislados de ratones BALB/c inmunizados, estimulados *in vitro* con el scFv L36 purificado.

Está bien documentado que el predominio de las subclases IgG2a e IgG2b en el ratón se relaciona con el desvío de la respuesta inmune hacia un patrón Th1 (32; 58; 142). Las respuestas Th1 se caracterizan por la liberación de IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ , mientras que IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 están asociadas con la respuesta Th2 (45; 81). En el suero de los ratones inmunizados con el plásmido pCR3.1-L36-DI predominaba el IFN- $\gamma$  con niveles muy bajos de IL-4, mientras que en el suero de ratones inmunizados con el scFv purificado en presencia de IFA se detectaban niveles equivalentes de ambas citoquinas (Figuras 13B y 13C).

A continuación, se procedió a estudiar el perfil de secreción de citoquinas *in vitro* por esplenocitos de ambos grupos, obtenidos 28 días después del inicio de la inmunización. Los esplenocitos fueron estimulados *in vitro* con scFv L36 purificado y, a las 72 horas de estimulación, se recogieron los sobrenadantes fueron recogidos y fueron analizados mediante ELISA. La inmunización con scFv L36 emulsionado con IFA indujo una respuesta mixta, mientras que la inmunización con ADN plasmídico indujo altos niveles de IFN- $\gamma$ , y casi nulos de IL-4 (Figuras 13D y 13E).

## 2- MULTIMERIZACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES MEDIANTE FUSIÓN CON PROTEÍNAS EUCARIÓTICAS

### 2.1- Diseño de una construcción génica formada por un anticuerpo recombinante en formato scFv y la región de trimerización del dominio NC1 del colágeno XVIII

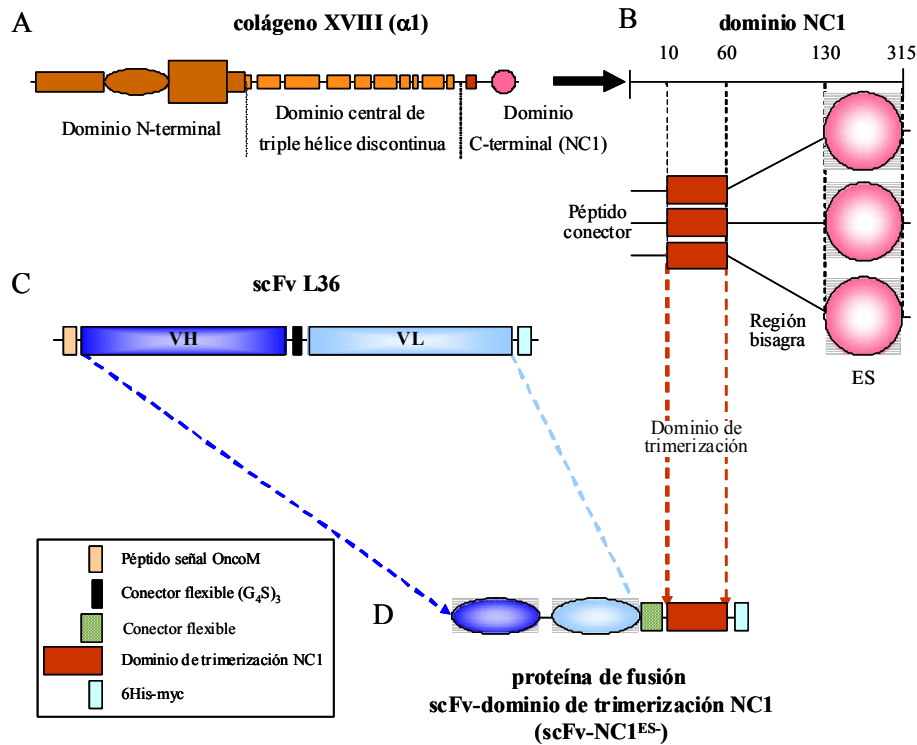
El colágeno XVIII se caracteriza por poseer un dominio central con estructura de triple hélice discontinua, que está flanqueado por dominios que no poseen estructura de triple hélice (Figura 14A). En su extremo carboxiterminal se encuentra el dominio NC1 (dominio no colagenoso) compuesto de tres segmentos (Figura 14B): una región de trimerización en el extremo aminoterminal, implicado en el ensamblaje de los homotrímeros; un conector flexible sensible a la acción de las proteasas; y la endostatina (ES), un dominio globular compacto situado en el extremo carboxiterminal (151; 152).

Con el objeto de generar una proteína de fusión que comprendiera un scFv y la región de trimerización del NC1 (NC1<sup>ES-</sup>), se diseñó una construcción génica que contiene los genes del scFv L36 (Figura 14C) y del NC1<sup>ES-</sup> (Figura 14B), mediante un péptido conector artificial (*linker*), creando así la proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES-</sup> (Figura 14D). Se construyó el vector pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES-</sup>, derivado del plásmido pCR3.1-L36, en el cual se insertó un *linker* artificial entre el scFv y la región de trimerización del dominio NC1<sup>ES-</sup>. Este vector incluye, bajo el control del CMV, el péptido señal OncoM y las etiquetas peptídicas 6His-myc para su detección y/o purificación (Figura 15A).

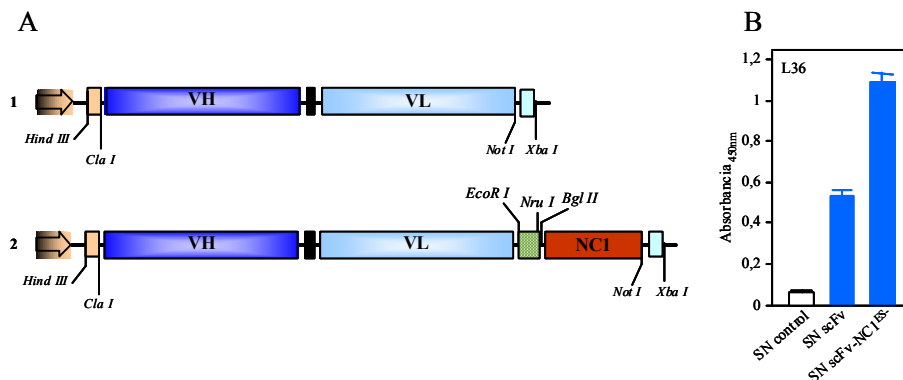
#### 2.1.1- Caracterización estructural y funcional

Ambos plásmidos se transfectaron en células HEK-293 humanas y, a las 48 horas, se midieron los niveles de AcR funcional mediante ELISA. En el sobrenadante de las células transfectadas con el plásmido control (pCR3.1) no se detectó expresión de L36, mientras que en el sobrenadante de las células transfectadas con los plásmidos pCR3.1-L36 o pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES-</sup>, se detectó la presencia de AcR funcional. La señal fue más alta con el formato scFv-NC1<sup>ES-</sup> que con el formato scFv (Figura 16B). Los AcRs se purificaron a partir de MCLS obtenido de transfectantes estables mediante IMAC y se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia *Western* en condiciones reductoras. Como se observa en la Figura 16A, ambas proteínas, scFv y scFv-NC1<sup>ES-</sup>, presentaban un alto grado de pureza y unos pesos moleculares aparentes de 28,8 kDa y 37,6 kDa, respectivamente.





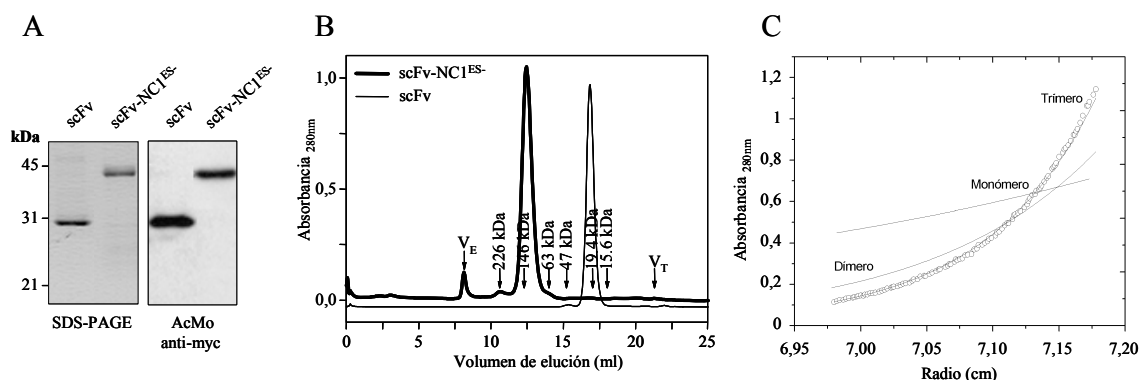
**Figura 14.** (A) Estructura de la cadena  $\alpha 1$  del colágeno XVIII murino. Presenta un dominio central de triple hélice discontinua, un largo dominio de trombospondina aminoterminal y un dominio no colagenoso (NC1) carboxiterminal. (B) El dominio NC1 se compone de tres segmentos: una región de trimerización en el extremo aminoterminal, implicado en el ensamblaje de los homotrimeros; un conector flexible sensible a la acción de las proteasas; y la endostatina (ES), un dominio globular compacto situado en el extremo carboxiterminal. (C) Estructura lineal del scFv L36. (D) representación esquemática de la estructura génica de la proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES-</sup>.



**Figura 15.** (A) Representación esquemática de las construcciones génicas derivadas del AcR L36 en formato scFv (1) y scFv-NC1<sup>ES-</sup> (2). (B) Análisis funcional, mediante ELISA, del reconocimiento de LM-111 inmovilizada por los distintos AcRs purificados.

La naturaleza oligomérica del scFv L36-NC1<sup>ES-</sup> se analizó mediante ensayos de cromatografía de filtración en gel y de ultracentrifugación analítica. El scFv L36-NC1<sup>ES-</sup> eluía con un único pico con un tamaño estimado de 109,3 kDa (Figura 16B), que corresponde a un trímero. La distribución de masas, en experimentos de equilibrio de sedimentación, correspondía a un trímero (Figura 16C). Estos resultados demuestran la naturaleza trimérica del

scFv L36-NC1<sup>ES-</sup>, una naturaleza conferida por el dominio de trimerización NC1<sup>ES-</sup>, dado que el scFv L36 es monomérico en las mismas condiciones.



**Figura 16.** (A) Análisis mediante SDS-PAGE y transferencia *Western* en condiciones reductoras, de los AcRs secretados por células HEK-293 transfectadas con el vector pCR3.1-L36 o pCR3.1-L36-NC1<sup>ES-</sup>. (B) Perfil de elución del scFv L36 y de la proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES-</sup>, en un ensayo de cromatografía de filtración en gel. El volumen de exclusión ( $V_E$ ) y el total ( $V_T$ ) aparecen indicados. Los volúmenes de elución de los marcadores de peso molecular aparecen indicados con flechas y su tamaño. Ambos cromatogramas han sido escalados e incluidos en la misma figura. (C) Determinación de la naturaleza trimérica de la proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES-</sup>, mediante un ensayo de equilibrio de sedimentación, los círculos abiertos indican los datos experimentales y las líneas muestran el perfil teórico de un monómero, dímero y trímero.

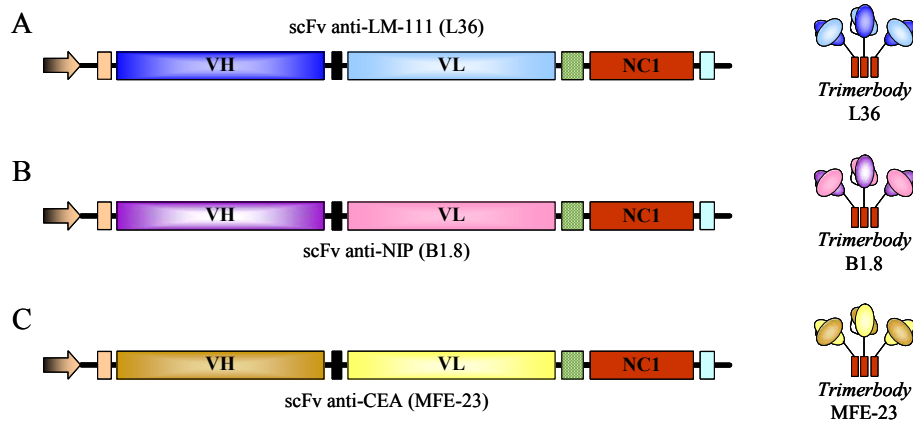
Este AcR trimérico, generado mediante la fusión de la región de trimerización del dominio NC1 del colágeno XVIII con un scFv (scFv-NC1<sup>ES-</sup>), se denominó *Trimerbody*.

## 2.2- Diseño de construcciones génicas para la expresión de trímeros scFv-NC1<sup>ES-</sup> (*Trimerbodies*) con diferente especificidad

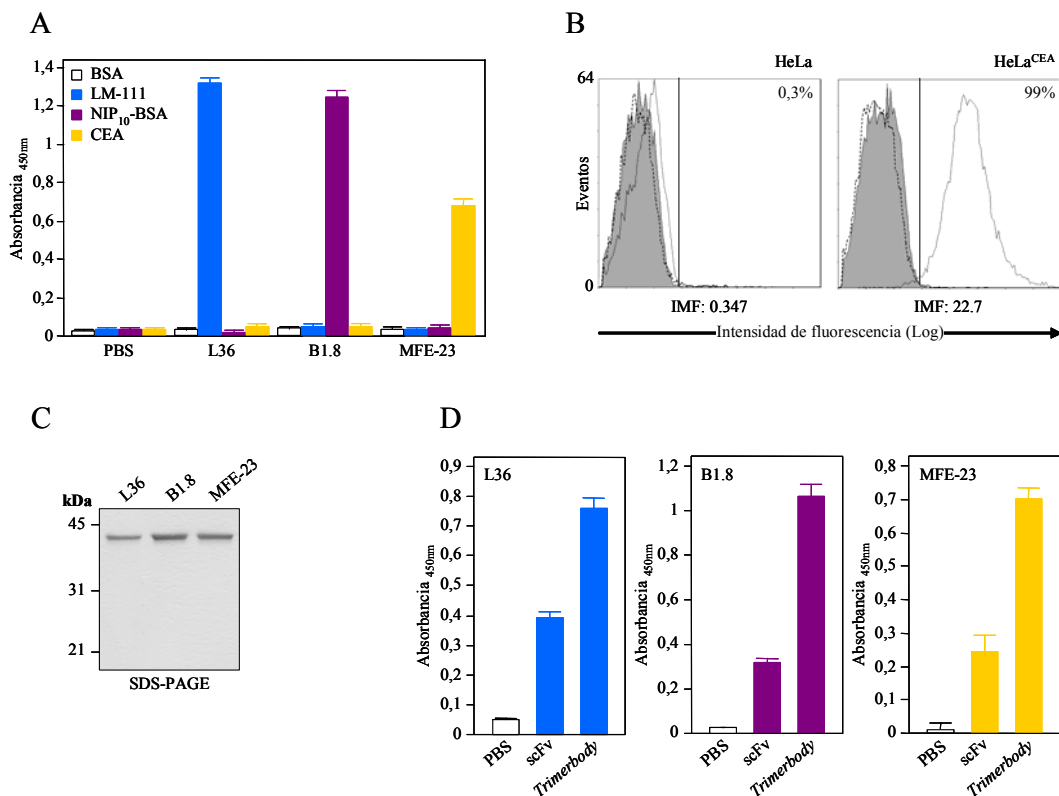
### 2.2.1- Estudio de la especificidad

Con el fin de determinar la capacidad del dominio NC1<sup>ES-</sup> para trimerizar otros scFvs con diferente especificidad, se construyeron los plásmidos pBEL2-linker-NC1<sup>ES-</sup> y pLAV39-linker-NC1<sup>ES-</sup>, que codifican los genes del AcR B1.8 (anti- hapteno NIP) (Figura 17B) y MFE-23 (anti-CEA humano) (Figura 17C) en formato *trimerbody*, respectivamente. Con dichos plásmidos se transfectaron células HEK-293. Los estudios funcionales, mediante técnicas de ELISA, demostraron que los *trimerbodies* eran expresados en forma funcionalmente activa y reconocían específicamente a su Ag diana, purificado e inmovilizado sobre plástico (Figura 18A) y expresado en la superficie celular (Figura 18B). Mediante SDS-PAGE, en condiciones reductoras, se demostró que los tres *trimerbodies* presentaban una movilidad electroforética similar, concordante con los tamaños teóricos de 37,6 kDa para el *trimerbody* L36; 37,1 kDa para el *trimerbody* B1.8; y 37,5 kDa para el *trimerbody* MFE-23 (Figura 18C). En una serie de ELISA comparativos entre el formato scFv y el formato *trimerbody*, se observó que en todos los casos estudiados la señal fue más alta con el *trimerbody* que con el scFv (Figura 18D).

Sin embargo, no es posible establecer comparaciones, ya que cada molécula de *trimerbody* lleva tres etiquetas myc, lo que origina una amplificación de la señal en la detección por ELISA.



**Figura 17.** Representación esquemática de las construcciones génicas generadas a partir del pCR3.1-L36-NCI<sup>ES-</sup> (A), con los genes del scFv B1.8 (B), y del scFv MFE-23 (C).



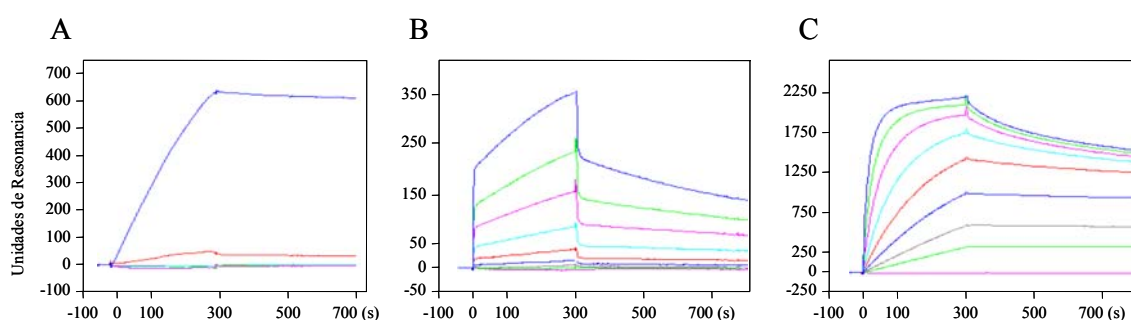
**Figura 18.** (A) Análisis funcional, mediante ELISA, de la interacción entre los *trimerbodies* L36, B1.8 y MFE-23, presentes en el sobrenadante de células 293T transfectadas, con BSA, LM-111, NIP<sub>10</sub>-BSA y CEA. (B) Estudio por citometría de flujo de la interacción entre los *trimerbodies* B1.8 (línea punteada) y MFE-23 (línea sólida), purificados a partir del sobrenadante de células 293T transfectadas, y el Ag CEA expresado en la superficie celular. El control isotópico aparece en gris. (C) Análisis, mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, de los *trimerbodies* (L36, B1.8 y MFE-23) secretados por células 293T transfectadas. (D) Análisis comparativo, mediante ELISA de la interacción entre los AcRs L36, B1.8 y MFE-23 purificados en formato scFv o *trimerbody* con LM-111, NIP<sub>10</sub>-BSA o CEA.

### 2.2.2- Estudio de la afinidad mediante resonancia de plasmón superficial

Para determinar la potencial ganancia funcional (avidez) del *trimerbody* frente al scFv, se realizaron ensayos de SPR con los AcRs B1.8 (en formato scFv y *trimerbody*) presentes en el MCLS de células 293T y purificados, en cantidades equimolares. Las moléculas NIP<sub>10</sub>-BSA o BSA, como control unión inespecífica, se inmovilizaron en el *chip*. Con el objeto de minimizar los efectos del transporte de masas y la reunificación entre ligando y analito para los análisis cinéticos, se inmovilizó una pequeña cantidad de NIP<sub>10</sub>-BSA, quedando ajustada a 100 unidades de resonancia (UR). El análisis de los MCLS indicaba una clara diferencia en el comportamiento entre el scFv y el *trimerbody* B1.8, indicando además que ni el MCLS del scFv ni el del *trimerbody* L36, además del MCLS de las células 293T no transfectadas, reconocían el complejo NIP<sub>10</sub>-BSA (Figura 19A). El scFv B1.8 (Figura 19B) presentó menores ratios de asociación y mayores velocidades de disociación que el *trimerbody* B1.8 (Figura 19C). Las constantes cinéticas de asociación ( $k_a$ ), de disociación ( $k_d$ ) y de equilibrio ( $K_D$ ) aparecen en la Tabla 8.

TABLA 8                      Constantes cinéticas ( $k_a$ y $k_d$ ) y de equilibrio ( $K_D$ ) de los AcRs B1.8				
AcR	NIP <sub>10</sub> -BSA (UR)	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M)
scFv B1.8	~ 100	$1,0 \times 10^4 \pm 1,7 \times 10^2$	$2 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-7}$
<i>trimerbody</i> B1.8	~ 100	$4 \times 10^5 \pm 6,1 \times 10^3$	$6 \times 10^{-4} \pm 1,1 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-9}$

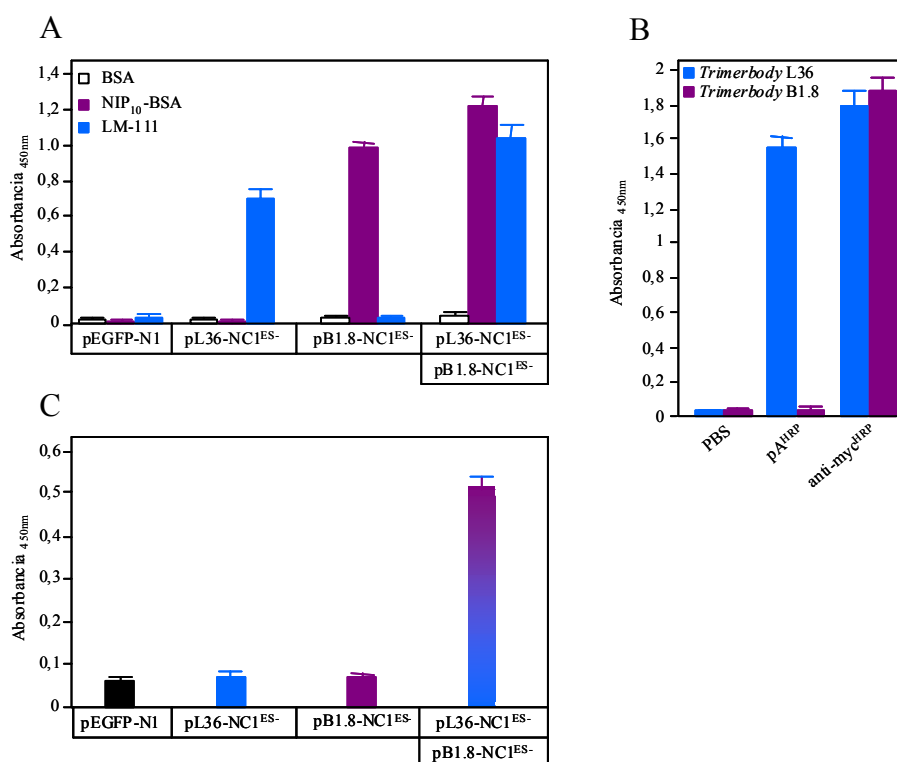
Los datos indican que el *trimerbody* B1.8 estaría uniéndose de manera multivalente, lo que haría aumentar la afinidad funcional calculada según estas condiciones. Por último, indicar que el *trimerbody* B1.8 alcanzó la saturación, no así el scFv, que además mostró una disociación más rápida, sugiriendo que el *trimerbody* tiene mayor capacidad de unión que el scFv.



**Figura 19.** Análisis de la afinidad funcional de los AcRs B1.8 en formato scFv y *trimerbody* frente a NIP<sub>10</sub>-BSA inmovilizado (A) Análisis comparativo de MCLS de células 293T no transfectadas (magenta) o transfectadas con los vectores de expresión que codifican el scFv L36 (verde); *trimerbody* L36 (azul cian); scFv B1.8 (rojo); y *trimerbody* B1.8 (azul). Sensogramas representativos correspondientes a las curvas (diluciones 1:2) de unión del scFv B1.8 (B) purificado [diluciones 1:2 a partir de 1.200 nM (azul)], y del *trimerbody* B1.8 (C) purificado [diluciones 1:2 a partir de 800 nM (azul)]. Las muestras se inyectaron a una velocidad de 20  $\mu$ l/min, durante 5 min, y la fase de disociación fue registrada durante 8 min.

### 2.2.3- Generación de *trimerbodies* biespecíficos

Con el objetivo de disponer de una prueba adicional sobre la multivalencia del formato scFv-NC1<sup>ES-</sup>, intentamos generar un *trimerbody* biespecífico que reconociera simultáneamente LM-111 y conjugados NIP<sub>10</sub>-BSA. Para ello, células 293T se transfectaron con los plásmidos pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES-</sup> y/o pBEL2-linker-NC1<sup>ES-</sup>. El sobrenadante de células 293T, transfectadas con los vectores pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES-</sup> o pBEL2-linker-NC1<sup>ES-</sup>, reconocía específicamente LM-111 o NIP<sub>10</sub>-BSA, mientras que el sobrenadante de las células cotransfectadas con los plásmidos pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES-</sup> y pBEL2-linker-NC1<sup>ES-</sup> reconocía ambos Ags (Figura 20A).



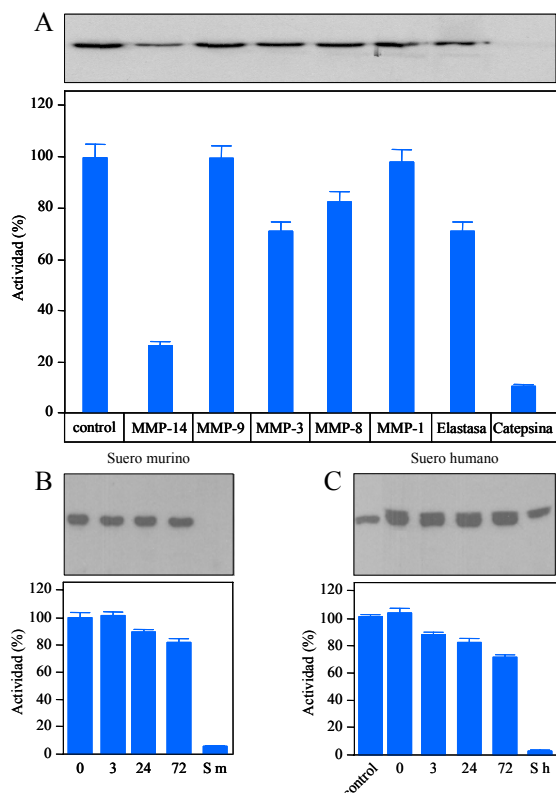
**Figura 20.** (A) Análisis funcional, mediante ELISA, de la interacción entre los *trimerbodies* presentes en el sobrenadante de células 293T transfectadas individualmente con los vectores pEGFPN1, pCR3.1-L36-NC1<sup>ES-</sup>, pB1.8-NC1<sup>ES-</sup> o cotransfectadas con los vectores pCR3.1-L36-NC1<sup>ES-</sup> y pB1.8-NC1<sup>ES-</sup>, de los Ags BSA, NIP<sub>10</sub>-BSA y LM-111. (B) Determinación, mediante ELISA, de la presencia de moléculas bivalentes en el sobrenadante de células 293T cotransfectadas con los vectores pCR3.1-L36-NC1<sup>ES-</sup> y pB1.8-NC1<sup>ES-</sup>. La captura se realizó con NIP<sub>10</sub>-BSA inmovilizado y el revelado con proteína A<sup>HRP</sup> o con el AcMo anti-myc<sup>HRP</sup>. (C) Determinación mediante *sandwich* de ELISA, de la presencia de *trimerbodies* biespecíficos funcionales en el sobrenadante de 293T transfectadas con los vectores pCR3.1-L36-NC1<sup>ES-</sup> o pB1.8-NC1<sup>ES-</sup> o cotransfectadas con los vectores pCR3.1-L36-NC1<sup>ES-</sup> y pB1.8-NC1<sup>ES-</sup>. Los *trimerbodies* con, al menos, un scFv L36 interaccionan con el Ag de captura (LM-111), tras varios lavados se añadió una solución NIP<sub>10</sub>-BSA, y la detección de los *trimerbodies* biespecíficos (L36/B1.8) se realizó con un Ac anti-BSA.

A continuación, para determinar si una molécula de *trimerbody* podía contener ambos scFv (L36 y B1.8), se realizaron varios ELISA. En un primer ensayo, el sobrenadante de transfectantes dobles se añadió sobre placas tapizadas con NIP<sub>10</sub>-BSA para la captura de

*trimerbodies* con, al menos, un scFv B1.8. La presencia de uno o más scFv derivados de L36, en las moléculas unidas a NIP<sub>10</sub>-BSA, se demostró mediante la adición de proteína A conjugada con HRP, que interacciona con la región VH<sub>3</sub> humana de L36, no así con la región VH<sub>1</sub> murina de B1.8 (Figura 20B). Para demostrar la presencia de moléculas de *trimerbody* biespecíficas funcionales, se realizó un ELISA sobre placas tapizadas con LM-111. Tras la captura de los *trimerbodies* portadores de, al menos, un scFv L36 y tras varios lavados, se añadió una solución del complejo NIP<sub>10</sub>-BSA. El paso final de revelado del scFv- NC1<sup>ES</sup>- biespecífico se realizó con un Ac anti-BSA (Figura 20C).

#### 2.2.4- Estudios de estabilidad *in vitro*

Para que un AcR pueda ser utilizado *in vivo* como agente diagnóstico o terapéutico, debe conservar su integridad estructural y su actividad funcional en contextos no favorables como en el torrente sanguíneo -en presencia de proteínas séricas- o como el microambiente peritumoral, muy rico en proteasas. La estabilidad del *trimerbody* L36, tras su incubación frente a diferentes proteinasas presentes en el contexto tumoral, fue analizada mediante transferencia *Western* y mediante ELISA. En la Figura 21A se observa que el *trimerbody* L36 mantuvo su integridad y funcionalidad, con actividades superiores al 70%, frente a la mayoría de las proteasas analizadas. Únicamente la MMP-14 degradó parcialmente la molécula de *trimerbody* L36 (quedando un 30% de actividad), y la catepsina L degradó completamente el *trimerbody* L36.



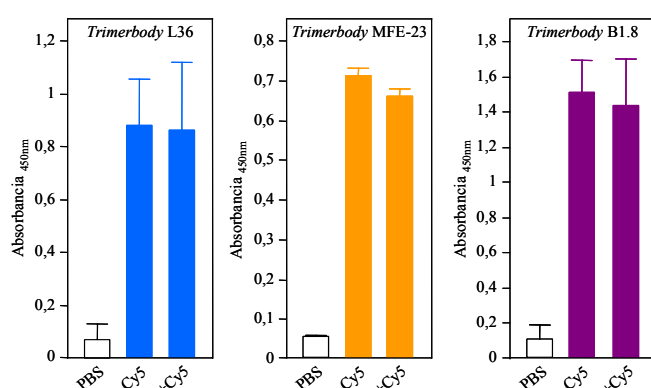
**Figura 21.** Análisis, mediante transferencia *Western* y ELISA, de la estabilidad estructural y funcional del *trimerbody* L36 tras su incubación, a 37 °C, frente a una batería de proteasas de la matriz (A), o frente a suero murino (B) o humano (C).

Demostrada la estabilidad frente a proteasas, se analizó su comportamiento en presencia de suero murino (Figura 21B) o humano (Figura 21C). El *trimerbody* L36 conservó su capacidad de reconocimiento de LM-111 (actividad superior al 80%), incluso tras una incubación durante 72 horas a 37 °C, en ambas condiciones. El análisis mediante transferencia *Western* demuestra que el *trimerbody* mantiene la integridad estructural a lo largo del ensayo.

## 2.2.5- Estudios de localización de depósitos tumorales *in vivo*

### 2.2.5.1- Conjugación de los *trimerbodies* con cianina 5

Los ACRs, multivalentes y de tamaño intermedio, presentan excelentes propiedades para la localización *in vivo* de depósitos tumorales (71). Dado que el formato *trimerbody* cumple ambos criterios y, además, es muy estable, se decidió estudiar su capacidad para localizar tumores *in vivo*. La técnica de imagen por fluorescencia *in vivo* es similar a la microscopía de fluorescencia, diferenciándose únicamente en que se trabaja a nivel macroscópico. Los fluorocromos con emisión cercana al infrarrojo (NIR), son los más usados ya que reducen el fondo o “ruido de emisión” causado por la materia orgánica (118; 131). El fluorocromo cianina 5 (Cy5) emite en la longitud de onda de 670<sub>nm</sub>, tiene un peso molecular de 0,79 kDa y se puede conjugar mediante enlaces covalentes dirigidos a los residuos lisina presentes en la proteína.



**Figura 22.** Determinación, mediante ELISA, de la funcionalidad de los *trimerbodies* L36, MFE-23, y B1.8 antes y después de su conjugación con el fluorocromo cianina 5 (Cy5).

Todos los ACRs generados en este trabajo, B1.8 (anti-hapteno NIP), MFE-23 (anti-CEA) y L36 (anti-laminina), este último con formatos scFv y *trimerbody*, se purificaron y se conjugaron con Cy5. Como se observa en la Figura 22, el proceso de conjugación no alteró la funcionalidad de ninguno de ellos. El número de moléculas de Cy5 conjugadas por *trimerbody* resultó en una relación de 1,4-1,8 moléculas de Cy5 por cada una de *trimerbody*.

### 2.2.5.2.- Estudios de imagen molecular *in vivo*

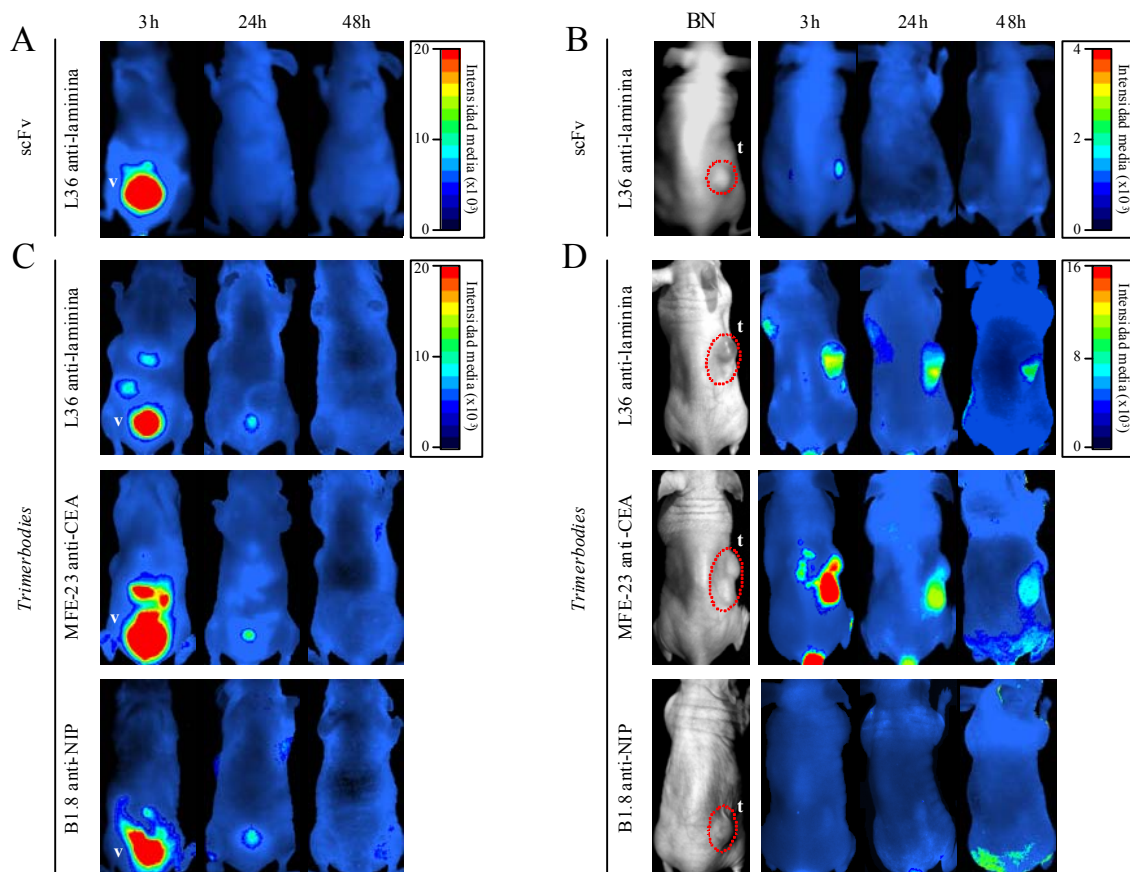
En ratones atímicos desnudos nu/nu se implantaron vía s.c., en la región dorsal, diferentes tipos de tumores humanos: fibrosarcomas (HT1080), adenocarcinomas gástricos (MKN45) y adenocarcinomas de cérvix (HeLa). Cuando los tumores alcanzaron un volumen



aproximado de  $0,2 \text{ cm}^3$  se inocularon, por vía i.v.,  $100 \mu\text{g}$  de cada uno de los AcRs conjugados con Cy5 (AcRs-Cy5). A las 3, 24 y 48 horas después de su administración se tomaron imágenes de las regiones ventral y dorsal.

El estudio de las imágenes dorsales de los ratones sirvió para localizar los AcRs-Cy5 en el depósito tumoral y para detectar posibles localizaciones inespecíficas en el organismo del animal. En algunos ratones se observó en la vecindad del punto de inoculación, una imagen debida a la extravasación local del AcR-Cy5.

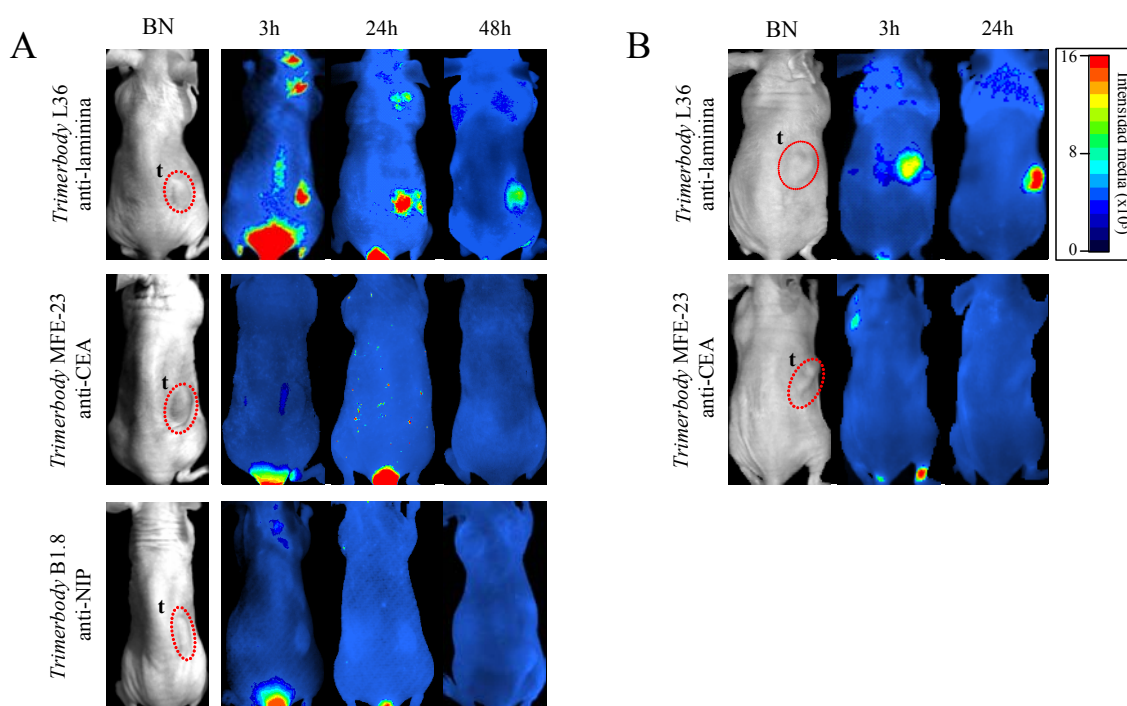
En ninguno de los grupos que recibieron el *trimerbody* B1.8, se detectó localización de la proteína marcada el depósito tumoral (Figura 23D y 24A). El *trimerbody* MFE-23 localizó específicamente los tumores formados por células  $\text{CEA}^+$  (Figura 23D). La señal se detectó durante al menos 48 horas, teniendo su máxima intensidad a las 3 horas de la inoculación (Figuras 23D y 25B). No se detectó emisión de señal en los tumores derivados de células  $\text{CEA}^-$ : tanto HT1080 (Figura 24A) como HeLa (Figura 24B).



**Figura 23.** Estudio de imagen molecular *in vivo*, de ratones atímicos desnudos nu/nu portadores de tumores humanos  $\text{CEA}^+$ . Los AcRs (scFv L36 y *trimerbodies* L36, MFE-23 y B1.8), conjugados con Cy5, se inocularon vía i.v. en ratones portadores de tumores MKN45 (carcinoma gástrico) implantados vía s.c. en la región dorsal. Las imágenes ventrales del scFv L36 (A) y de los *trimerbodies* (C) y las imágenes dorsales del scFv L36 (B) y de los *trimerbodies* (D), fueron tomadas a las 3, 24 y 48 horas después de la inoculación i.v. (v: vejiga, t: tumor).



Por último, el scFv y el *trimerbody* derivado del AcR L36 localizaron específicamente todos los tipos de tumores estudiados (Figuras 23B, 23D, 24A y 24B). Sin embargo, las diferencias en la intensidad de la señal entre ambos formatos fueron muy evidentes. La señal del scFv sólo fue detectable a las 3 horas después de su administración i.v. (Figura 23B), mientras que la señal del *trimerbody* se detectó durante las 48 horas del ensayo, teniendo su máxima intensidad a las 24 horas después de la administración, y mostrando una intensidad claramente superior a la del scFv (Figura 23D). Como indican las Figuras 25C y 25D, existe una relación directa entre emisión de fluorescencia tras la administración del *trimerbody* L36-Cy5, y la vascularización del tumor. Se puede apreciar cómo la mayor intensidad de fluorescencia observada en el tumor HT1080 se corresponde con un mayor número de vasos y con una distribución más homogénea, que la del resto de tumores (Figuras 25C, 25D y 26B).

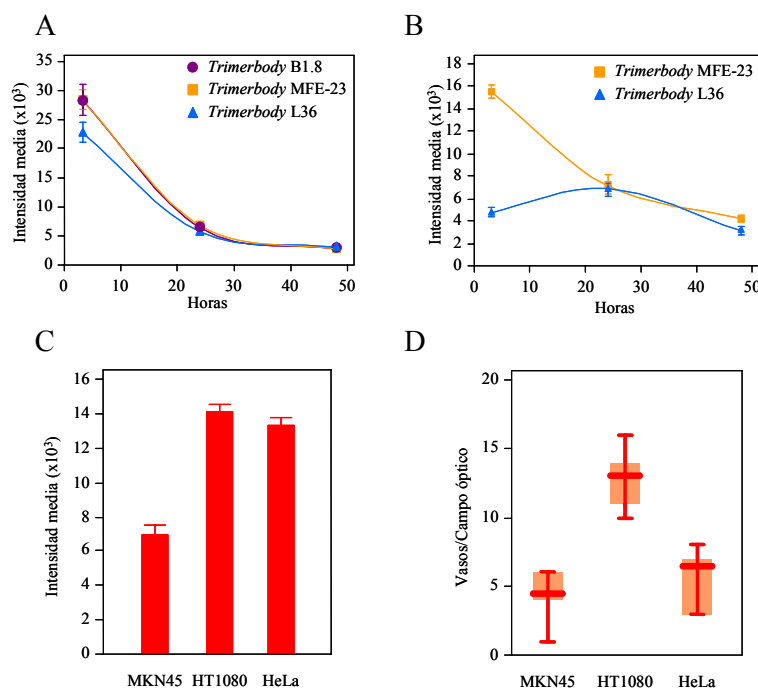


**Figura 24.** Estudio de imagen molecular *in vivo*, de ratones atímicos desnudos nu/nu portadores de tumores humanos CEA. Los *trimerbodies* L36, MFE-23 y B1.8, conjugados con Cy5, se inocularon vía i.v. en ratones portadores de tumores HT1080 (fibrosarcoma) (A) o HeLa (carcinoma de cérvix) (B), implantados vía s.c. Las imágenes dorsales de los *trimerbodies* fueron tomadas a las 3, 24 y 48 horas después de la inoculación i.v. (t: tumor).

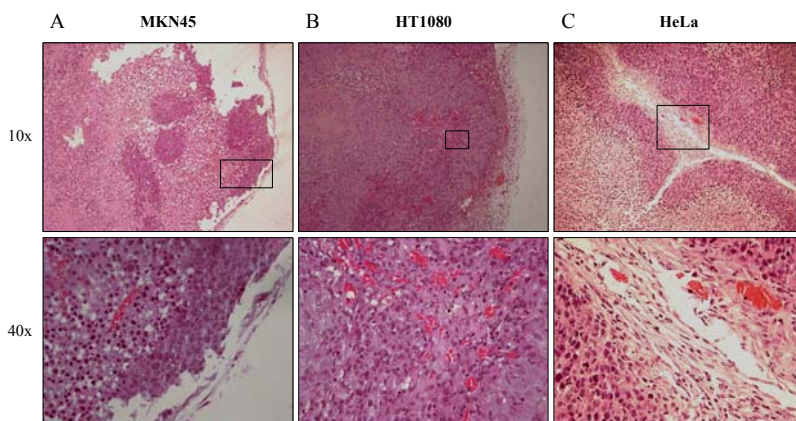
## 2.2.6- Estudio farmacocinético: biodistribución y aclaramiento renal

Además de los grupos de ratones utilizados para la localización específica de depósitos tumorales, los ratones portadores de tumores derivados de células MKN45 se utilizaron para los estudios farmacocinéticos. Para realizar una estimación del aclaramiento renal, se tomaron imágenes de la región ventral a las 3, 24 y 48 horas, después de la administración por vía i.v. de los AcRs-Cy5. A las 3 horas, la señal en la zona vesical era muy intensa, indicando una rápida y activa eliminación de los AcRs por vía renal (Figuras 23A y 23C). A las 24 horas, la señal en

esta zona era muy débil, con valores muy cercanos a autofluorescencia para los *trimerbodies* y nulos para el scFv, indicando que había sido completamente eliminado (Figuras 23A, 23C y 25A). A las 48 horas no se detectó ninguna señal, indicando una completa eliminación de las moléculas de *trimerbody*-Cy5 no unidas a su diana. Los animales que recibieron *trimerbody* L36 y *trimerbody* MFE-23, mostraron una señal de baja intensidad en la región ventral superior, atribuible probablemente a un cierto grado de eliminación de los *trimerbodies*-Cy5 por vía hepatobiliar.



**Figura 25.** Estudio farmacocinético de los *trimerbodies* marcados con Cy5 inoculados vía intravenosa (i.v.) en ratones atímicos desnudos nu/nu portadores de tumores MKN45 implantados vía s.c. en la región dorsal. (A) Análisis del aclaramiento renal de los *trimerbodies* L36, MFE-23 y B1.8 a las 3, 24 y 48 horas después de su inoculación i.v. (B) Análisis de la evolución de la intensidad media de señal específica de tumor de los *trimerbodies* L36 y MFE-23 a las 3, 24 y 48 horas después de su inoculación i.v. (C) Intensidad media de señal específica de tumor obtenida a las 24 horas después de la inoculación i.v. del *trimerbody* L36 en los tumores implantados: MKN45, HT1080 y HeLa. (D) Determinación del número de vasos sanguíneos por campo en los tumores MKN45, HT1080 y HeLa.



**Figura 26.** Tinción con hematoxilina-eosina de las piezas tumorales MKN45 (A), HT1080 (B); HeLa (C) extraídas de ratones atímicos desnudos nu/nu. Visualización a 10 y 40 aumentos.

Para los estudios de biodistribución, se midió *ex vivo* (*postmortem*) la emisión de fluorescencia por órganos aislados (hígado, bazo, pulmón, riñón) y en el tumor, a las 24 y 48 horas de la administración de los *trimerbodies*-Cy5. Los niveles de fluorescencia obtenidos se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9 Biodistribución de los <i>trimerbodies</i> -Cy5 en ratones atímicos desnudos nu/nu portadores de tumor s.c. derivados de células MKN45 <sup>1</sup>								
INTENSIDAD MEDIA	24 h				48 h			
	PBS	B1.8	L36	MFE-23	PBS	B1.8	L36	MFE-23
HÍGADO	3396 ± 295	2960 ± 251	4680 ± 1143	2863 ± 198	3458 ± 369	3582 ± 309	3584 ± 673	3677 ± 343
BAZO	2885 ± 115	2685 ± 523	2312 ± 194	2942 ± 135	2895 ± 104	2599 ± 141	2517 ± 214	2732 ± 114
PULMÓN	2535 ± 296	2635 ± 168	2373 ± 361	2668 ± 468	2547 ± 303	2297 ± 253	2202 ± 290	2412 ± 110
RIÑÓN	2803 ± 150	2693 ± 110	4816 ± 1046	2827 ± 206	2790 ± 124	2704 ± 184	3924 ± 820	2866 ± 188
TUMOR	2759 ± 301	2399 ± 311	6941 ± 525	7163 ± 960	2851 ± 256	2451 ± 206	3182 ± 362	4201 ± 256

<sup>1</sup>A los tiempos indicados, tras la inyección i.v. de los *trimerbodies*-Cy5 B1.8, L36 y MFE-23, los ratones fueron sacrificados, sus órganos extraídos y tomadas las imágenes de fluorescencia. Los datos se presentan como la intensidad media de fluorescencia y la desviación estándar de las mediciones (n=4).

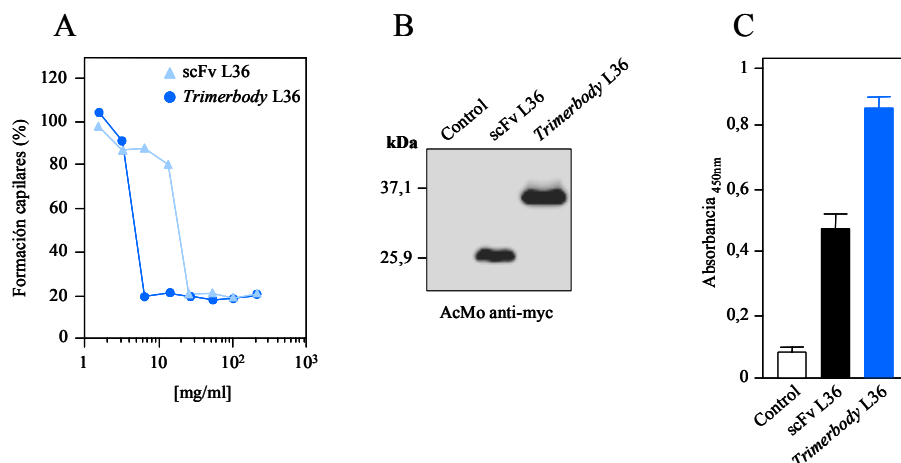
El análisis mostró ausencia señal en la mayoría de órganos estudiados. Únicamente se detectó presencia del *trimerbody* L36 en el riñón a las 24 y 48 horas, y en el hígado en niveles algo superiores. En ningún caso la señal específica de los órganos analizados fue similar o cercana a la señal obtenida en cualquiera de los tumores.

## 2.2.7- Efecto terapéutico de un *trimerbody* expresado localmente

El scFv L36 se generó a partir de una genoteca de fagos seleccionada frente a LM-111. El scFv es altamente específico, interacciona con laminina pero no con otros componentes de la MEC y reconoce un epítipo conformacional muy conservado, que desempeña un importante papel funcional (147). La formación de estructuras CLS por células endoteliales humanas cultivadas sobre Matrigel™ es bloqueada por el scFv L36 en forma dosis-dependiente (148; 149). En un estudio comparativo comprobamos que el AcR L36 era mucho más eficiente inhibiendo la formación de estructuras CLS, en formato *trimerbody* que en formato scFv (Figura 28A).

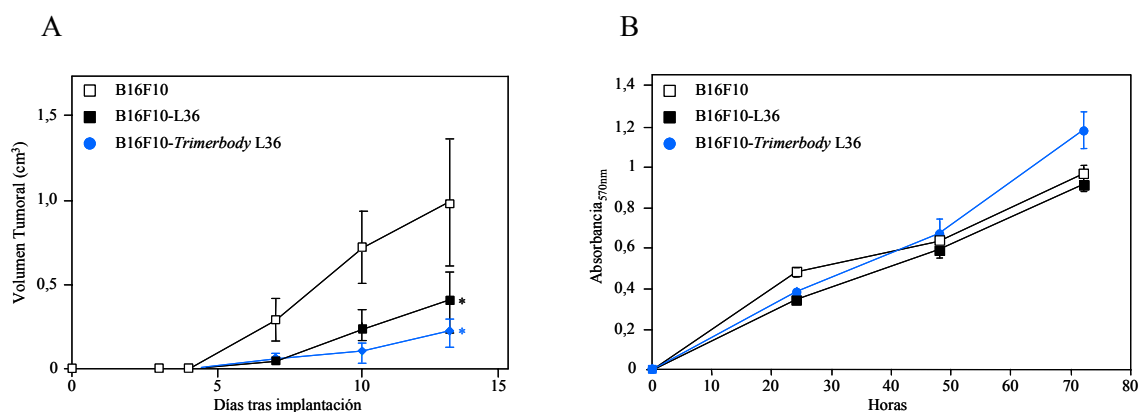
Para demostrar si esta mejora de la actividad funcional *in vitro* se correlacionaba con una mayor actividad *in vivo*, estudiamos el efecto de ambos AcRs producidos localmente en un modelo de melanoma murino. Para ello, células tumorales B16F10 se transfectaron con los vectores pCR3.1-L36 o pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES</sup>; la expresión de AcRs L36 (scFv o

*trimerbody*) funcionalmente activos se demostró mediante transferencia *Western* y ELISA (Figuras 27B y 27C).



**Figura 27.** (A) Ensayo comparativo de la inhibición de la formación de estructuras CLS en un ensayo estándar de Matrigel™, por el AcR L36 en formato scFv y *trimerbody*. (B) Análisis mediante transferencia *Western* del AcR L36 (scFv y *trimerbody*) secretado por células B16F10 transfectadas con los vectores pCR3.1-L36 o pCR3.1-L36-NC1<sup>ES-</sup>. (C) Determinación mediante ELISA, de la presencia de scFv L36 y *trimerbody* L36 funcional en el sobrenadante de células B16F10 transfectadas con los vectores pCR3.1-L36 y pCR3.1-L36-NC1<sup>ES-</sup>.

Se establecieron tres grupos de ratones (n=5) en los que se inocularon a nivel s.c., en la región dorsolateral, células B16F10 secretoras de scFv L36 (B16F10-L36); células B16F10 secretoras de *trimerbody* L36 (B16F10-*Trimerbody* L36); o células B16F10 no modificadas genéticamente (B16F10). Los tumores se midieron periódicamente. La secreción local de moléculas de AcR L36, en formato scFv o *trimerbody*, retrasó significativamente el crecimiento tumoral a partir de día 7 manteniéndose hasta el final del ensayo, respecto al grupo control (Figura 28A). El estudio de proliferación celular *in vitro* indicó que las tres líneas tumorales mantenían tasas de proliferación muy similares (Figura 28B).

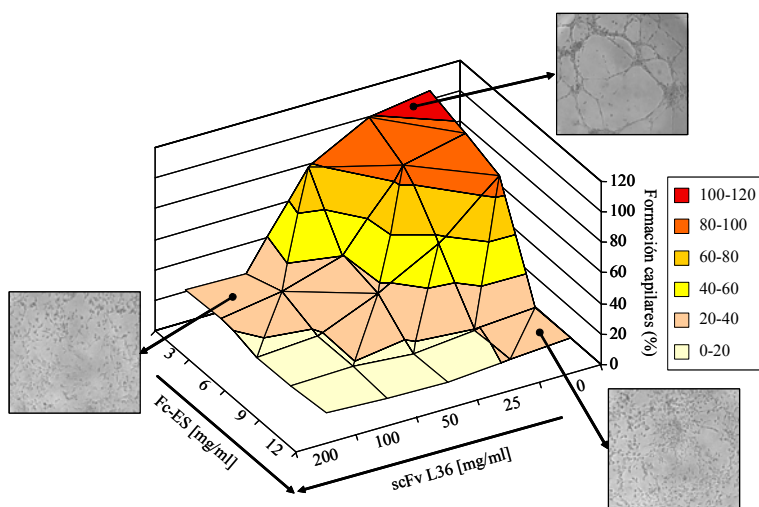


**Figura 28.** (A) Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* por los AcRs scFv L36 y *trimerbody* L36 secretadas localmente por células B16F10 transfectadas con los vectores pCR3.1-L36 (B16F10-L36) o pCR3.1-L36-NC1<sup>ES-</sup> (B16F10-*Trimerbody* L36). Se muestra la media de los volúmenes tumorales de cada grupo (n=5) y la desviación estándar en cada punto. La significación estadística de las diferencias entre grupos se calculó usando el test *t* de Student (\*,  $p \leq 0.05$ ). (B) Estudio de proliferación celular *in vitro* de células B16F10 no transfectadas, o transfectadas con los vectores pCR3.1-L36 o pCR3.1-L36-NC1<sup>ES-</sup>.

## 2.3- Diseño de una construcción génica formada por un anticuerpo recombinante en formato scFv y el dominio NC1 del colágeno XVIII completo

### 2.3.1- Efecto combinado de la endostatina y del scFv L36 sobre la formación de estructuras capilariformes *in vitro*.

Recientemente, se ha demostrado que la ES inhibe el proceso formación de CLS dependiente de la MEC (99). El tratamiento con ES dimérica, en forma de Fc-ES, en el momento de plaqu coastas las células endoteliales sobre Matrigel™, inhibió la formación de estructuras tubulares, manteniendo las células endoteliales dispersas y mostrando una morfología similar a la de las células endoteliales cultivadas sobre plástico (*fibroblast-like*). Estos cambios morfológicos son similares a los observados cuando los cultivos de células endoteliales se tratan con L36, en formato scFv o *trimerbody* (Figura 27A). Como se observa en la Figura 30, la adición de Fc-ES y/o scFv L36 en dosis crecientes, a cultivos de células endoteliales sobre Matrigel™, muestra un claro efecto aditivo sobre la inhibición de la formación de estructuras CLS.

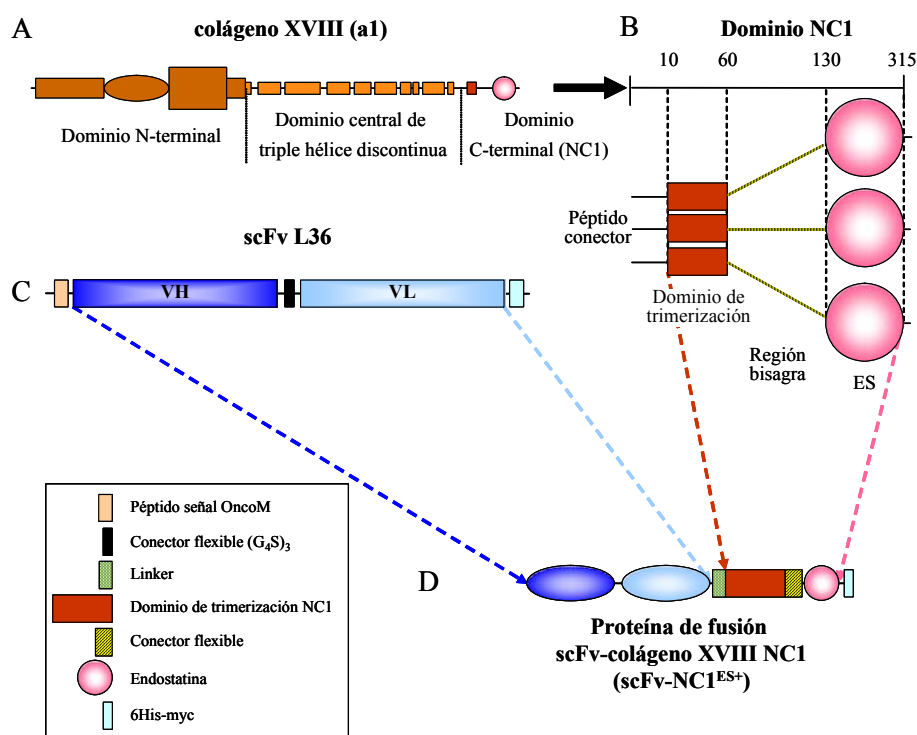


**Figura 29.** Ensayo de inhibición de la formación de estructuras CLS, en un ensayo estándar de Matrigel™, por el scFv L36 y/o la endostatina dimérica (Fc-ES).

La ES deriva del dominio NC1 del colágeno XVIII, que se libera proteolíticamente en forma trimérica y, posteriormente, se convierte en ES monomérica, de aproximadamente 20 kDa (1; 99; 119; 151). Para intentar combinar ambas actividades funcionales en una única molécula, se diseñó una construcción génica que comprende los genes del scFv L36 (Figura 30C) y del dominio NC1 completo (NC1<sup>ES+</sup>) (Figura 30B), unidos mediante un conector artificial (*linker*), creando así la proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> (Figura 30D). Además del pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES+</sup>, se generaron, como controles, los vectores que incluían el dominio completo de NC1 (pCR3.1-NC1) o el dominio de ES (pCR3.1-ES). Todos los vectores incluyen, bajo el promotor de transcripción del CMV, el péptido señal OncoM y las etiquetas peptídicas 6His-myc para su detección y/o purificación (Figura 31).

### 2.3.2- Caracterización estructural y funcional

Las proteínas recombinantes se purificaron a partir de medio condicionado obtenido de transfectantes estables, mediante IMAC, y se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia *Western* en condiciones reductoras. El revelado con el AcMo anti-myc indicaba que el patrón de migración correspondía al tamaño molecular teórico de 28,8 kDa para el scFv L36; de 37,6 kDa para el *trimerbody* L36; de 23,8 kDa para la ES; y de 65.6 kDa para la proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES+</sup>. La preparación purificada de proteína recombinante NC1 presentaba un patrón de bandas más heterogéneo, que correspondían al dominio NC1 con diferentes grados de procesamiento. El AcMo anti-ES reveló, en la preparación de L36-NC1<sup>ES+</sup>, una banda extra de menor tamaño (*ES-like*) no detectada con el AcMo anti-myc, indicando la presencia de monómeros de ES procesados. En la preparación de ES purificada, se detectó una banda extra de menor tamaño, no detectada por el AcMo anti-myc, que indicaba la presencia de monómeros de ES no fusionados a la etiqueta 6His-myc (Figura 33A).

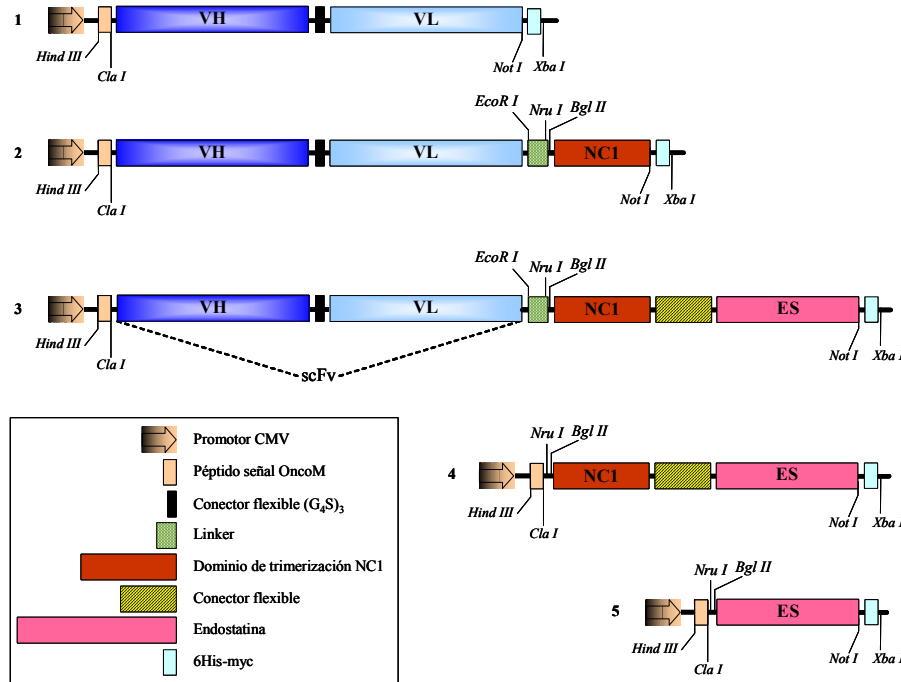


**Figura 30.** (A) Estructura lineal de la cadena  $\alpha 1$  del colágeno XVIII murino. Presenta un dominio central de triple hélice discontinua, un largo dominio de trombospondina aminoterminal y un dominio no colagenoso (NC1) carboxiterminal. (B) El dominio NC1 se compone de tres segmentos: una región de trimerización en el extremo aminoterminal, implicado en el ensamblaje de los homotrimeros; un conector flexible, sensible a la acción de las proteasas; y la endostatina (ES), un dominio globular compacto situado en el extremo carboxiterminal. (C) Estructura lineal del scFv L36. (D) representación esquemática de la estructura génica de la proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES+</sup>.

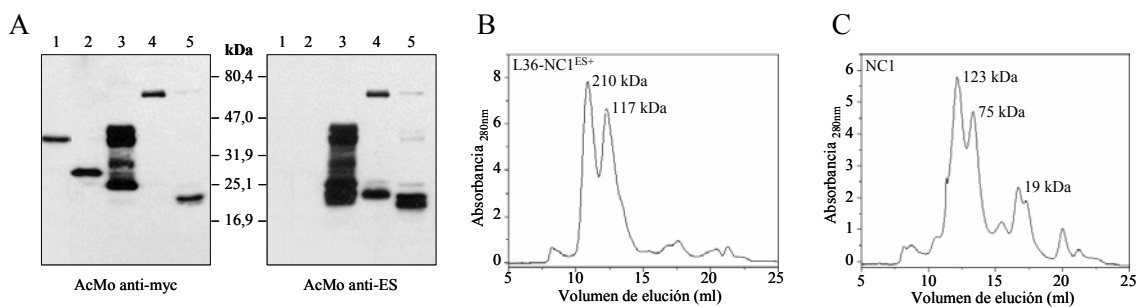
La naturaleza oligomérica de la proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> se analizó mediante cromatografía de filtración en gel. En la Figura 32B se observa que el scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> eluía en un pico mayoritario con un tamaño estimado de 210 kDa, consistente con una



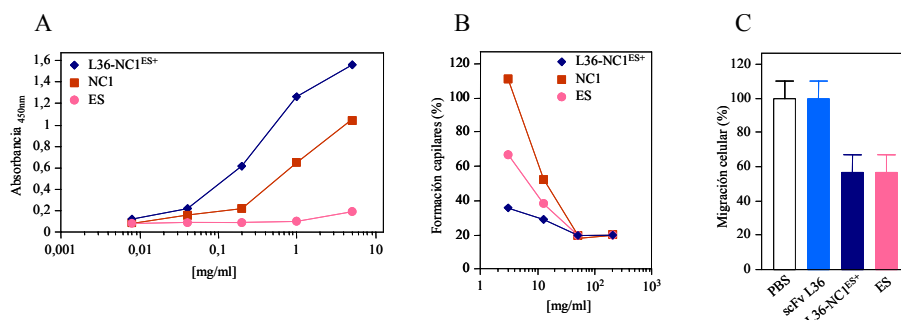
estructura trimérica, y otro de menor tamaño, 117 kDa, que podría corresponder con fragmentos carentes de ES. En la preparación de proteína NC1 se observaron tres picos: uno de 123 kDa, que correspondería al dominio NC1 íntegro, no procesado; uno de 75 kDa que correspondería con el dominio NC1 en diferentes grados de procesamiento; y uno de 19 kDa que correspondería a la ES monomérica (Figura 32C).



**Figura 31.** Representación esquemática de las construcciones génicas pCR3.1-L36 (1), que contiene el scFv L36; pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES-</sup> (2), que contiene el scFv L36 y la región de trimerización del dominio NC1 (NC1<sup>ES-</sup>); pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES+</sup> (3), que contiene el scFv L36 y el dominio NC1 completo (NC1<sup>ES+</sup>); pCR3.1-NC1 (4), que contiene el dominio NC1 completo (NC1<sup>ES+</sup>); y pCR3.1-ES (5), que contiene el dominio endostatina (ES).



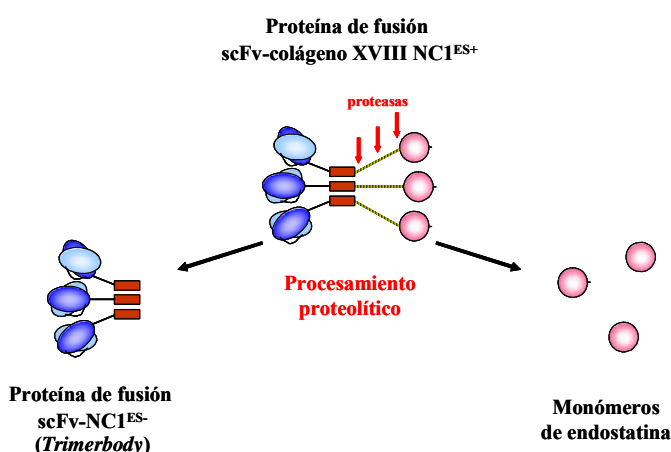
**Figura 32.** (A) Análisis mediante transferencia Western, de las proteínas purificadas scFv L36 (1); trimerbody L36 (2); scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> (3); NC1 (4); y ES (5). La detección se realizó con un AcMo anti-myc y un AcMo anti-ES. Perfil de elución de las proteínas purificadas scFv L36-linker-NC1<sup>ES+</sup> (B) y NC1 (C), en un ensayo de cromatografía de filtración en gel.



**Figura 33.** (A) Análisis funcional, mediante ELISA, de la interacción de las proteínas purificadas scFv L36-NC1<sup>ES+</sup>, NC1 y ES con LM-111 inmovilizada. (B) Ensayo comparativo de la inhibición de la formación de estructuras CLS en un ensayo estándar de Matrigel<sup>TM</sup> por las proteínas recombinantes purificadas scFv L36-NC1<sup>ES+</sup>, NC1 y ES, (C) Ensayo comparativo de la inhibición de la migración de células endoteliales en presencia de PBS y de 20 µg/ml de scFv L36-NC1<sup>ES+</sup>, NC1 o ES.

### 2.3.3- Procesamiento proteolítico

La capacidad de diferentes proteasas para procesar la proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> y el dominio NC1 (Figura 34) se evaluó mediante transferencia *Western* y revelado con un AcMo anti-ES. Las proteasas más eficientes fueron la MMP-14 y la MMP-3. La incubación de MMP-14 con NC1 generó monómeros de ES (Figura 35A), mientras que la incubación con el scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> generó monómeros de ES y *trimerbody* L36 (Figuras 35B y 35D). Los monómeros de ES presentaron un patrón de migración heterogéneo (desde 20 hasta 25 kDa), debido probablemente a que la proteólisis de la región bisagra puede dejar residuos extras en la molécula de ES, o a la pérdida de la etiqueta peptídica 6His-myc (Figuras 35C y 35D). El resto de MMPs analizadas fueron menos eficientes (Figura 35B) y mostraron un patrón proteolítico similar al del dominio NC1 nativo (Figura 35A). La elasta y la cathepsina L degradaron la proteína.



**Figura 34.** Modelo esquemático de la estructura de la proteína scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> y de su procesamiento proteolítico generando monómeros de endostatina y *trimerbodies* L36.

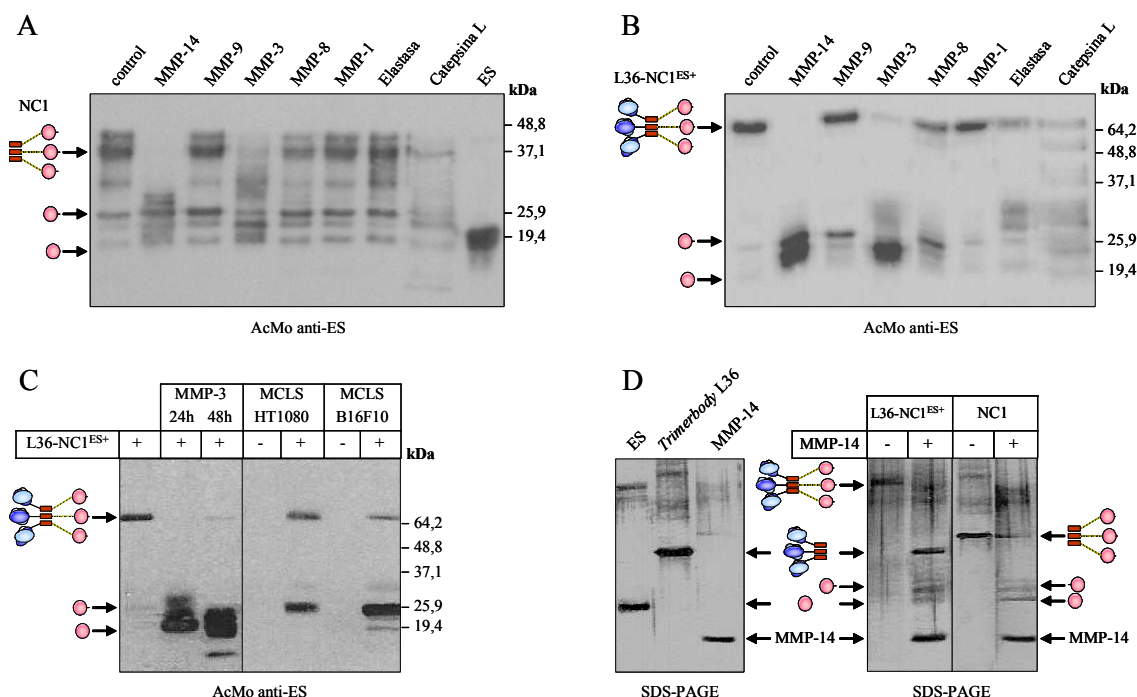
Cada célula tumoral posee un perfil de expresión de proteasas característico (53; 57). El procesamiento del scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> por las proteasas presentes en el medio condicionado de células HT1080 (fibrosarcoma) y B16F10 (melanoma), se analizó mediante transferencia



*Western* con un AcMo anti-ES. El resultado, tras 48 horas de incubación, indicaba que las MMPs presentes en el sobrenadante de estas líneas procesaban parcialmente el scFv L36-NC1<sup>ES+</sup>, generando monómeros de ES y *trimerbodies* (Figura 35C).

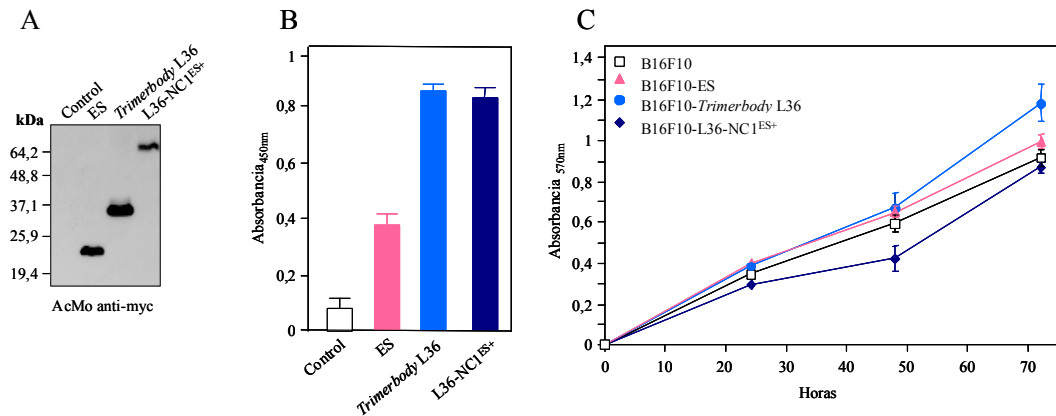
### 2.3.4- Efecto terapéutico de la proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> expresada localmente

La actividad antitumoral *in vivo* de la proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES+</sup>, se estudió en un modelo de melanoma murino. Para ello, células tumorales B16F10 se transfectaron con los vectores pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES-</sup>, pCR3.1-ES y pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES+</sup>. La expresión de las proteínas funcionalmente activas se demostró mediante transferencia *Western* y ELISA (Figuras 36A y 36B).



**Figura 35.** Procesamiento proteolítico de las proteína recombinantes purificadas NC1 (A y D) y scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> (B, C y D) por proteasas de la matriz purificadas, o por MCLS (C) obtenido de cultivos confluentes de las líneas tumorales HT1080 (fibrosarcoma humano) y B16F10 (melanoma murino). En el panel D se indica el patrón de migración de las proteínas purificadas no procesadas ES, *trimerbody* L36 y MMP-14. Todas las determinaciones se realizaron mediante SDS-PAGE y transferencia *Western* con un AcMo anti-ES.

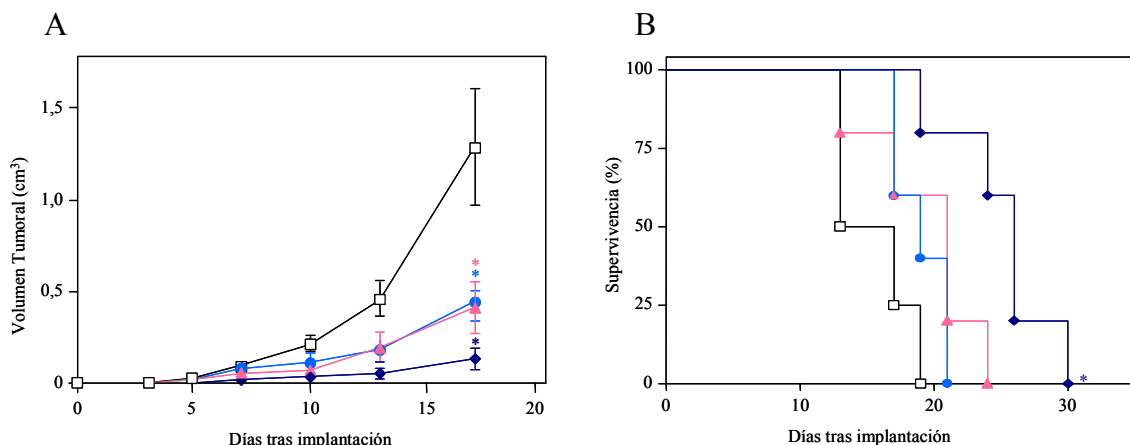
Se establecieron tres grupos de ratones (n=5) en los que se inocularon vía s.c., en la región dorsolateral, células B16F10 secretoras de scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> (B16F10-L36-NC1<sup>ES+</sup>), células B16F10 secretoras de *trimerbody* L36 (B16F10-*Trimerbody* L36), células B16F10 secretoras de ES (B16F10-ES) o células B16F10 no modificadas genéticamente (B16F10). Los tumores se midieron periódicamente. La secreción local de moléculas AcR L36, en formato scFv o *trimerbody*, retrasó significativamente el crecimiento tumoral, a partir de día 7 y hasta el final del ensayo, con respecto al grupo control (Figura 37A). El estudio de proliferación celular *in vitro* indicó que las tres líneas mantenían tasas de proliferación muy similares (Figura 36C).



**Figura 36.** (A) Análisis, mediante transferencia *Western* en condiciones reductoras, de la secreción de ES, *trimerbody* L36 y scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> por células B16F10 no transfectadas (B16F10), o transfectadas con los vectores pCR3.1-ES (B16F10-ES), pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES+</sup> (B16F10- *Trimerbody* L36); o pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES+</sup> (B16F10- L36-NC1<sup>ES+</sup>). (B) Determinación, mediante ELISA, de la presencia de ES, *trimerbody* L36 y scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> funcional en el sobrenadante de células B16F10, B16F10-ES, B16F10-*Trimerbody* L36, o B16F10- L36-NC1<sup>ES+</sup>. (C) Estudio de la proliferación celular *in vitro* de células B16F10, B16F10-ES, B16F10-*Trimerbody* L36, o B16F10-L36-NC1<sup>ES+</sup>.

En el grupo que secretaba el *trimerbody* L36 la diferencia fue significativa a partir del día 13, mientras que en el grupo productor de ES, la diferencia fue significativa a partir del día 17. El mayor grado de inhibición se observó en el grupo productor de L36-NC1<sup>ES+</sup>, en el cual las diferencias fueron estadísticamente significativas a partir del día 7.

La curva de supervivencia de los grupos reveló que el grupo que expresaba el L36-NC1<sup>ES+</sup> presentaba un aumento significativo de la supervivencia, respecto del grupo control, a día 19, donde se conservaba el 80%, teniendo esta diferencia un valor estadístico de  $p=0.007$  (Figura 37B).



**Figura 37.** (A) Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* por las proteínas ES, *trimerbody* L36 o L36-NC1<sup>ES+</sup> secretadas localmente por células B16F10. Se muestra la media de los volúmenes tumorales de cada grupo (n=5) y la desviación estándar en cada punto. (B) Estudio de la supervivencia de los grupos portadores de tumores B16F10 no transfectadas (□); o tumores B16F10 transfectados con los vectores pCR3.1-ES (▲); pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES+</sup> (●); y pCR3.1-L36-linker-NC1<sup>ES+</sup> (◆). La significación estadística de las diferencias entre grupos se calculó usando el test *t* de Student (\*,  $p \leq 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

“Cómo admitir como deformidad  
lo que no es repetición,  
si la maldita elección,  
la posibilidad,  
es la sola solución.”

A la sombra de una mentira  
(Rosendo Mercado)

## 1- La Proteína III del Bacteriófago: “escenario o actor” en la presentación de repertorios

Las bacterias han sido el huésped preferido para la producción de AcRs, debido a sus ventajas en cuanto a manipulación, transformación, cinética de crecimiento y condiciones de fermentación (38; 45; 164). Los trabajos iniciales demostraron que la expresión periplásmica de AcRs en bacterias permitía una purificación rápida y sencilla de AcRs funcionales. La expresión de AcRs en el periplasma bacteriano sigue una vía de ensamblaje similar a la que ocurre durante la producción de Acs en el retículo endoplásmico del linfocito B y permite producir moléculas activas en un compartimento subcelular que está relativamente libre de enzimas proteolíticas (145). Por el contrario, la expresión citoplasmática es menos apropiada, ya que el procesamiento postraducciona (plegamiento, formación de puentes disulfuro y glicosilación) de las cadenas polipeptídicas nacientes es inadecuado. Esto origina la formación de cuerpos de inclusión en el citoplasma de la bacteria que contiene la proteína, en una forma no funcional, y cuya recuperación es laboriosa e ineficiente.

El desarrollo de la TPPF, ha supuesto un revulsivo para el desarrollo de nuevos sistemas de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* (95; 168). La pérdida de función es una observación frecuente cuando los AcRs, obtenidos mediante TPPF, se expresan en forma soluble. Esta pérdida de función ha sido atribuida clásicamente a la pérdida de avidéz y a problemas de estabilidad. Teniendo en cuenta que la mayoría de las genotecas de AcRs son de exposición monovalente, la pérdida de función es debida fundamentalmente a problemas de estabilidad del AcR.

Para incrementar la estabilidad de los scFvs se han desarrollado numerosos métodos, que abarcan desde la inserción de puentes disulfuro entre las regiones V (54), hasta la introducción de mutaciones en las FRs (49; 96). Otra diana de las estrategias de estabilización es el *linker* que conecta las regiones V, ya que tanto longitud y secuencia, influyen en su capacidad de estabilización. De la misma manera, se ha estudiado la influencia que el orden de los dominios V (VH-VL y VL-VH) tienen en la funcionalidad de los scFvs, pero no se ha encontrado ninguna regla general y, por tanto, el orden óptimo tiene que ser determinado para cada scFv individualmente (34). Otro método consiste en la inserción en FRs “estables” de CDRs; obtenidas de FRs “no estables” (87). Sin embargo, estos métodos individualizados son procedimientos muy laboriosos y complejos.

Un método general para aumentar los niveles de expresión, solubilidad, y estabilidad de los AcRs consiste en fusionar el scFv a proteínas con “propiedades beneficiosas” (36), entre las que se incluyen, la proteína de unión a maltosa (MBP) (10; 66), la fosfatasa alcalina (59), la proteína D de la cápside del fago lambda (49), fragmentos de la IL-2 humana (144), y la proteína verde fluorescente (59). Otro método general implica la co-expresión de AcRs con

proteínas chaperonas (95; 158). En este sentido, algunos resultados sugieren que la pIII podría desempeñar actividades de chaperona al unirse a proteínas que se encuentran en el periplasma (136).

La pIII está formada por tres dominios globulares separados por *linkers* flexibles: los dominios DI y DII, que interactúan con los receptores de la bacteria (*F-pilus* y TolA); y el dominio DIII, que integra la pIII en la cápside del fago. La estructura tridimensional de los dominios amino-terminales de la pIII de los bacteriófagos homólogos M13 y fd ha sido resuelta y demuestra la existencia de interacciones entre los dominios DI y DII (73; 106). A partir de esta información, generamos construcciones génicas en las cuales dos scFvs, L36 y D4, se fusionaron a variantes truncadas de la pIII. La obtención de niveles de expresión similares entre las distintas construcciones indicaban que ninguna de las proteínas de fusión incrementaba la solubilidad del AcR, según el modelo Wilkinson-Harrison (172).

La presión aplicada durante el proceso de selección de un repertorio de AcR, presentado en el contexto del fago, favorece la identificación de AcRs de alta afinidad. Esto puede deberse a una optimización de las interacciones Ag-Ac, o indirectamente a una mejora de la estabilidad del AcR y, en consecuencia, a un incremento de la cantidad de Ac funcional. Un AcR expresado en la superficie de un fago podría considerarse como un dominio de unión (scFv) unido a una proteína irrelevante o bien como una entidad única: una proteína de fusión formada por el scFv y la pIII (scFv-pIII). Por lo tanto, la presión selectiva aplicada podría estabilizar el scFv o la proteína de fusión scFv-pIII.

En aquellos casos donde la selección haya estabilizado el scFv, la fusión con dominios de la pIII no modificará la actividad funcional del AcR. En los casos donde la selección ha estabilizado el complejo scFv-pIII, el incremento de la actividad funcional podría deberse a un incremento de la fracción de AcR correctamente plegado, lo que asegura una mayor reactividad de la muestra; o bien a la formación de multímeros, que aumentan la avidéz del AcR. La formación de multímeros fue una observación clara cuando las proteínas de fusión scFv-DI-DII se analizaron mediante cromatografía de filtración en gel; sin embargo, el AcR funcionalmente activo se observó en las fracciones correspondientes a los monómeros y a los dímeros. Estos datos indican que la actividad funcional de la proteína de fusión scFv D4-DI-DII, en comparación con el scFv D4 aislado, es debida a una mayor proporción de proteína plegada correctamente. En el caso de scFv L36, las actividades del scFv y de la proteína de fusión scFv-DI-DII, son similares, lo que indica que el L36 es estable como scFv. El ligero aumento de la actividad observada tras la fusión con el DI podría deberse a un efecto combinado de estabilidad y avidéz, ya que tanto el monómero como el multímero son funcionalmente activos.

En conclusión, esta es la primera descripción del potencial de la pIII como chaperona. Queda por determinar si la pIII tiene la actividad chaperona intrínseca, si contiene elementos responsables del reclutamiento de componentes del sistema de plegamiento del periplasma

bacteriano; o bien sí mejora la interfaz de unión al Ag: la interfaz VH-VL para producir un parátipo con mayor flexibilidad que pueda soportar los cambios conformacionales producidos por la unión con el Ag sin ver comprometida su estabilidad. Propiedades similares han sido descritas con otras proteínas como la MBP (10), sin embargo, los efectos no son tan llamativos como los observados con la pIII, donde la reactividad de un AcR fue restaurada tras la fusión.

## **2- La Proteína III del Bacteriófago: “ayudante” del plegamiento y “adyuvante” inmunológico**

A lo largo del pasado siglo ha existido una gran controversia acerca del papel del sistema inmunitario en el control y eliminación de las células tumorales. El concepto de vigilancia inmunológica se originó a principios del siglo pasado, cuando Paul Ehrlich postuló que las células tumorales se originaban con mucha frecuencia y que, normalmente, eran eliminadas por los mecanismos inmunes del huésped. Medio siglo después, Burnet utilizó el término vigilancia inmunológica (29) para definir un estado de control, mediante el cual el sistema inmune del huésped reconocería Ags en los tumores emergentes y los eliminaría antes de que llegasen a ser clínicamente evidentes. Según esta hipótesis, la progresión del cáncer sería un suceso infrecuente en el que el tumor escapa al control ejercido por el sistema inmune.

Sin embargo, la hipótesis de la vigilancia inmunológica ha sido muy cuestionada. Uno de los principales obstáculos para validar esta teoría ha sido la dificultad para identificar Ags tumorales específicos, puesto que la mayoría de los Ags expresados en las células tumorales son moléculas propias, ignoradas por el sistema inmune. En los últimos años, gracias al desarrollo de nuevas metodologías, se han descrito numerosos AAT, que son reconocidos específicamente por clones de L<sub>T</sub>. Por ello, se están diseñando estrategias de inmunoterapia del cáncer, basadas, muchas de ellas, en promover o potenciar la activación de los L<sub>T</sub> frente a las células tumorales.

La primera generación de vacunas para el tratamiento del cáncer consistía en células tumorales viables irradiadas, con el objetivo de inducir respuestas linfocitarias policlonales. Se usaban células tumorales autólogas (13) o líneas celulares (171). También se han usado extractos celulares o proteínas purificadas o recombinantes, como el CEA o la mucina humana (MUC-1) (9). Las vacunas de ADN desnudo consisten en la administración de un plásmido en el cual se ha clonado el gen de interés (62). También pueden contener secuencias que actúen como adyuvantes inmunológicos. Las técnicas de biología molecular permiten introducir secuencias antigénicas en vectores virales. La infección viral y el daño tisular resultante atraerán a las células presentadoras de Ag, necesarias para una presentación antigénica adecuada (51).

En pacientes con linfomas B o mielomas, la inmunización con la Ig idiotípica, induce respuestas humorales y celulares específicas (12; 100). Los bacteriófagos ofrecen nuevas alternativas para el desarrollo de vacunas moleculares. En diferentes modelos animales se ha

observado que la inmunización con fagos recombinantes tiene una gran capacidad para generar una respuesta inmune sin el uso de adyuvantes (45).

En este trabajo demostramos que preservando la unión entre el scFv y el DI de la pIII, se promueve la multimerización del AcR y se potencia su inmunogenicidad. El DI de la pIII es capaz de inducir una respuesta inmune anti-idiotípica cuando se administra como proteína de fusión con un scFv modelo no inmunogénico (L36). Con un protocolo de inmunización adecuado, una vacuna de ADN desnudo que codifica una proteína de fusión scFv L36-DI induce una respuesta inmune Th1, caracterizada por una respuesta humoral IgG2a y altos niveles de IFN- $\gamma$ . La inmunización con el scFv purificado emulsionado con IFA indujo una respuesta mixta de Th1/Th2.

Las respuestas Th1 son más atractivas desde un punto de vista terapéutico, ya que se asocian con inducción de citotoxicidad celular, que desempeña un papel esencial en la defensa contra infecciones virales y tumores (114; 117). Las diferencias observadas podrían atribuirse a las distintas rutas seguidas por el Ag, así como a la diferente estructura molecular del Ag. Estudios previos han sugerido que la agregación del Ag puede amplificar una respuesta tipo Th1, promovida por el microambiente de citoquinas generado previamente por la inyección de ADN (83; 139). Distintos estudios inmunológicos han demostrado que la utilización de vacunas de ADN, que codifican fusiones de péptidos o scFvs con proteínas virales con capacidad de agregación, pueden inducir una respuesta inmune con un patrón predominante de tipo Th1 (83; 90; 110; 139; 153). En este sentido, el DI de la pIII ofrecería la ventaja de funcionar como un “adyuvante incorporado”, creando una conexión directa entre la generación de reactivos mediante TPPF y la vacunación.

### **3- Armazones de la Matriz Extracelular: “nuevas ideas” para mejorar las características físico-químicas y farmacocinéticas de los anticuerpos recombinantes**

El empleo de dominios de oligomerización de mamífero cuenta con la ventaja, si su secuencia está muy conservada o es de origen humano, de su menor o nula inmunogenicidad; lo que permitiría su aplicación diagnóstica o terapéutica. Una de las familias de proteínas con capacidad de multimerización mejor estudiada, es la del colágeno. Datos del grupo de Rupert Timpl demostraron que una región de 60 aminoácidos, situada en el extremo amino terminal del dominio NC1 (dominio no colagenoso), era responsable de la trimerización no covalente de las cadenas alfa del colágeno XVIII (151).

En nuestro trabajo se demuestra que la fusión, a través de un *linker* flexible, de esta región de trimerización del dominio NC1 del colágeno XVIII murino, al extremo C-terminal de un scFv, confiere un estado trimérico al AcR generado (“*trimerbody*”). La región de trimerización funciona independientemente de la especificidad del scFv. En este trabajo

generamos *trimerbodies* funcionales con especificidad frente al hapteno NIP, frente a un AAT expresado en la superficie celular (CEA) y frente a una proteína de la MEC (LM-11). Todos los *trimerbodies* se aislaron en forma activa a partir de medio condicionado, obtenido de células HEK-293 transfectadas, y fueron fácilmente purificados mediante IMAC. Los *trimerbodies* son triméricos en solución y poseen una excelente estabilidad y capacidad de unión al Ag. Los *trimerbodies* son muy eficientes reconociendo Ags purificados, inmovilizados sobre una placa o expresados en la superficie de una célula tumoral.

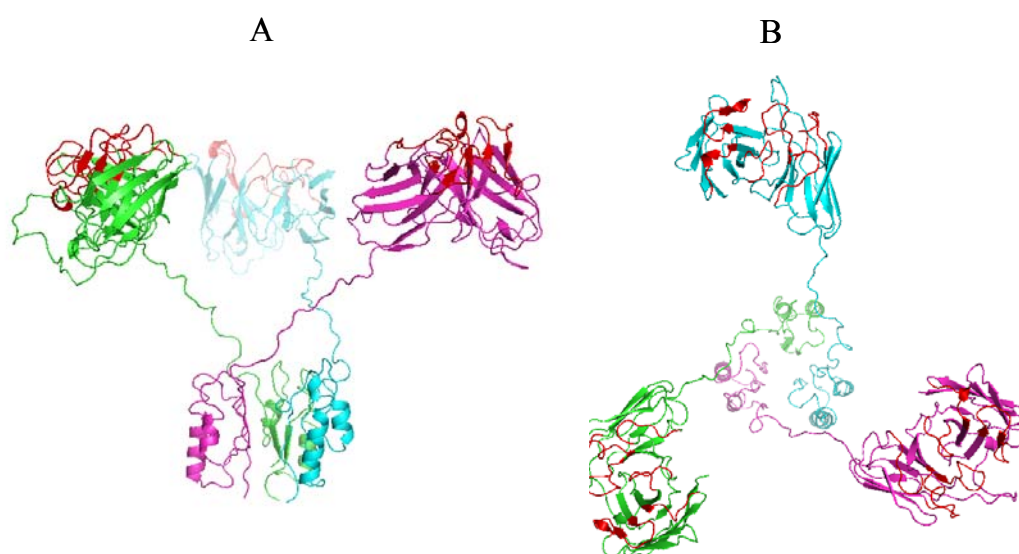
El análisis mediante SPR demostró que el AcR B1.8 en formato *trimerbody* tenía una señal de unión mayor que el AcR monomérico (en formato scFv) y, aparentemente, una disociación menor, consistente con la unión multivalente al Ag. El *trimerbody* anti-hapteno NIP tiene una afinidad funcional por el Ag (conjugados NIP<sub>10</sub>-BSA) unas 100 veces mayor, comparado con la versión monovalente. Este resultado sugiere que esta ganancia de afinidad podría ser debida al efecto de avidéz de un segundo sitio de combinación en la molécula de *trimerbody*. La presencia de, al menos, dos sitios de unión funcionales en una sola molécula de *trimerbody* fue posteriormente demostrada mediante la generación de AcRs biespecíficos. Los *trimerbodies* anti-LM-111 y anti-hapteno NIP se produjeron fácilmente mediante la co-expresión, en células humanas, de dos construcciones que codificaban los genes del scFv L36 o del scFv B1.8, unidos a la región de trimerización del dominio NC1 de colágeno XVIII.

La ganancia en afinidad, a partir de la avidéz, hace a los *trimerbodies* agentes muy atractivos para su empleo en técnicas de imagen *in vivo*, y como agentes alternativos a los AcRs diméricos (*diabodies* y *minibodies*). Se podría, por tanto, especular que los *trimerbodies* presentarían ventajas sobre los AcRs diméricos, aunque esta propiedad puede depender de la estructura y densidad del Ag reconocido por los scFvs. Para conseguir una interacción multivalente con moléculas expresadas en la superficie celular, los dominios de unión al Ag deberían apuntar en la misma dirección. Si una unión múltiple simultánea no es posible estéricamente, entonces la ganancia en afinidad funcional es probable que sea menor y debida únicamente al efecto de unión aumentado, que es dependiente de las tasas de difusión y la concentración del Ag en superficie (103).

El análisis del modelo tridimensional del *trimerbody* sugiere una estructura con forma de trípode con los dominios scFvs orientados hacia fuera (Figura 38). La flexibilidad entre los dominios de unión al Ag es otro aspecto importante en el diseño de AcRs multivalentes que son requeridos para el entrecruzamiento de receptores de superficie, bien en la misma célula o en células adyacentes. El espaciador de 21 residuos, con una longitud máxima de 79,8 Å en una conformación completamente extendida, es muy flexible, permitiendo numerosas geometrías de unión. Cuando una interacción Ag-Ac ocurre, la posibilidad de establecer una segunda interacción depende de la valencia, orientación y flexibilidad de los dominios de unión del Ag. Según nuestros cálculos, en una molécula de *trimerbody*, los scFvs que permanecen sin



interaccionar tienen un área de influencia aproximadamente, unas 11 veces mayor que otros formatos bivalentes, tales como los *diabodies* y los *minibodies*, aumentando así la probabilidad de una segunda interacción efectiva. La existencia de una unión multivalente podría reducir la constante de disociación (“*off rates*”), aumentando así el tiempo de retención del AcR unido al Ag diana. Recientemente, otro grupo investigador (44) ha utilizado una aproximación similar para multimerizar AcRs y ha demostrado que un esqueleto de péptidos cortos, similares al colágeno V, son capaces de promover la trimerización de fragmentos scFv. Una ventaja del *trimerbody* sobre este nuevo formato, denominado *collabody*, es su flexibilidad. La estructura más compacta del *collabody* reduce la accesibilidad de los scFvs, un parámetro crítico para la localización de tumores *in vivo*.



**Figura 38.** Vista lateral (A) y superior (B) del modelado molecular del *trimerbody* anti-laminina L36. en esta simulación cada monómero ha sido coloreado de forma diferente (verde, azul y púrpura). Las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cada scFv han sido coloreadas en rojo.

Así, la multimerización de scFvs presenta ventajas para las aplicaciones *in vivo*. Los AcRs, como los *diabodies* y *minibodies* han demostrado su potencial como agentes de localización *in vivo* (71). Nuestros datos demuestran que los *trimerbodies* son moléculas multivalentes, de tamaño intermedio y que presentan una alta estabilidad en condiciones fisiológicas. El potencial de los *trimerbodies* para la localización de depósitos tumorales *in vivo* se estudió en modelos experimentales de cáncer humano en ratones desnudos. Los *trimerbodies* anti-CEA localizan rápida y específicamente tumores CEA-positivos. La máxima señal en el tumor se observó a las 3 horas tras la inyección del AcR marcado con Cy5 y era lentamente eliminado a lo largo del tiempo. La fluorescencia aún era detectable en el tumor 48 horas después de la inyección de un *trimerbody* basado en el scFv MFE-23. Es importante destacar

que un *trimerbody* anti-LM-111 generado a partir del AcR L36, localizó de forma específica todos los tumores estudiados, independientemente de su estirpe histológica. En este caso, la señal máxima a nivel tumoral se observó a las 24 horas tras la administración del *trimerbody*. El AcR L36, en formato scFv, también se localizó específicamente en el tumor. Sin embargo, la señal era menor, probablemente debido a su rápida eliminación de la circulación (con una vida media menor de 15 minutos) y a su naturaleza monovalente (que implica bajos tiempos de retención) (3).

Según resultados previos, el epítipo reconocido por el AcR L36 está localizado en la parte media del brazo largo de la laminina, en un área altamente flexible, que corresponde a un sitio susceptible a la acción de proteasas. Este epítipo es únicamente accesible durante el ensamblaje de la membrana basal (MB) (147), donde la molécula de laminina intacta actúa como soporte para el reclutamiento de otros componentes de la MB (150). La expresión restringida de este epítipo a situaciones asociadas con la remodelación de la MB, podría explicar la captación más lenta del *trimerbody* L36, en comparación con el *trimerbody* MFE-23, que reconocen un Ag expresado en la superficie de la célula tumoral.

Para comprobar el efecto terapéutico de un *trimerbody*, empleamos como modelo el L36, donde se ha demostrado que el AcR, en formato scFv, administrado sistémicamente o expresado *in situ*, posee efecto antitumoral (148). Nuestros datos demuestran que el AcR L36 en versión *trimerbody*, es más efectivo en la inhibición de la formación de CLS *in vitro*, e inhibiendo el crecimiento tumoral *in vivo*. Así pues, los *trimerbodies* ofrecen oportunidades diagnósticas y terapéuticas prometedoras, basadas en su capacidad de localización tumoral *in vivo*. Algunas de las aplicaciones inmediatas de los *trimerbodies*, con especificidad frente a AAT o frente a Ags expresados en el estroma tumoral, incluyen el desarrollo de proteínas de fusión con citoquinas, enzimas, receptores truncados o IEAs (145).

#### **4- Armazones de la Matriz Extracelular: “mejora” funcional y “aporte” de funciones**

Los IEAs han recibido especial atención en protocolos de terapia antitumoral, dado su carácter de agentes no tóxicos y no inmunogénicos. Se han identificado más de 10 agentes con estas características (48), de los cuales la mayoría se originan a partir de componentes de la MB tras su degradación proteolítica. Los mejor caracterizados son la angiostatina y la ES. La ES es un inhibidor de la migración celular y de la morfogénesis capilar y se ha demostrado que reduce el crecimiento tumoral en modelos animales (119). Los mecanismos moleculares subyacentes no están claros, aunque se ha propuesto la unión a receptores de superficie celular (integrinas, heparán sulfatos, VEGFR-2, etc.) y la interacción con MMPs y con componentes de la MEC. En 1997, Boehm y colaboradores describen el empleo de la ES en modelos animales (22). En los

ratones no tratados con ES, los tumores (carcinoma pulmonar de Lewis, fibrosarcoma T421 y melanoma B16F10) crecieron rápidamente, provocando la muerte del animal. En cambio, en los ratones tratados con ES, se observó una reducción del volumen tumoral hasta alcanzar tamaños microscópicos. La administración cíclica de ES indujo un estado de quiescencia prolongada (22; 119). No obstante, en los ensayos clínicos realizados no se ha observado un efecto significativo de la ES sobre el crecimiento tumoral. Desgraciadamente, este no es un ejemplo aislado y los resultados obtenidos en ensayos clínicos con otros agentes antiangiogénicos tampoco son satisfactorios (16).

Las limitaciones de las terapias antiangiogénicas actuales son consecuencia directa de la complejidad del proceso y de la heterogeneidad, tanto fenotípica como funcional, de las CE en diferentes órganos y localizaciones, así como de la heterogeneidad y redundancia funcional de las proteinasas y de los factores angiogénicos que intervienen en los estadios iniciales del proceso de neoformación vascular. Se ha observado que la neutralización de alguno de estos factores, con fines terapéuticos con AcMos, puede originar la selección de variantes clonales que producen o dependen de otro u otros factores angiogénicos (16).

Otros problemas potencialmente importantes de las terapias antiangiogénicas son consecuencia del hallazgo de que algunos tumores altamente agresivos son capaces de generar estructuras capilares que no contienen células endoteliales (proceso denominado *vasculogenic mimicry*) (47; 68). Estas estructuras capilariformes están constituidas exclusivamente por células tumorales y por una delgada lámina de MB. La MB es un tipo especial y altamente organizado de MEC que proporciona soporte estructural y puntos de anclaje para las células circundantes. Estas interacciones (MB/moléculas de adhesión en la superficie de la CE), según su número y tipo, condicionan aspectos claves del comportamiento celular como el estado de diferenciación, la actividad migratoria, el grado y el perfil de secreción de proteasas, etc.

La incorporación de ARcs, con actividad antiangiogénica, en armazones proteicos derivados de la MB que contienen IEAs, representa una estrategia novedosa para producir agentes multiespecíficos capaces de bloquear simultáneamente dos o más dianas implicadas en el proceso de neoformación vascular. Con la información estructural y funcional disponible del dominio NC1 del colágeno XVIII y con los datos obtenidos a partir de las construcciones generadas para la obtención de AcRs multivalentes en formato *trimerbody*, hipotetizamos que sería posible generar una proteína de fusión multivalente y bifuncional, que incorporase el dominio NC1 completo (NC1<sup>ES+</sup>) y un AcR con capacidad antiangiogénica (L36) con formato scFv.

La ES deriva del dominio NC1 de los colágenos XV y XVIII, de donde es liberada proteolíticamente en forma trimérica y posteriormente se convierte en ES monomérica, de aproximadamente 20 kDa. En el extremo N-terminal de NC1 hay un dominio de trimerización de 60 residuos conectado con el módulo de ES, mediante una región bisagra flexible de 180

residuos, que contiene diversos sitios sensibles a proteasas, que liberan ES después de la escisión proteolítica. Los niveles de proteasas están aumentados en el microentorno tumoral, por lo que una proteína de fusión como la descrita (L36-NC1<sup>ES+</sup>) podría liberar *in situ* tanto monómeros de ES como trímeros de scFv.

La proteína de fusión se secretó por células humanas genéticamente modificadas en forma funcionalmente activa. La forma intacta tiene una masa molecular de 210 kDa aproximadamente, lo que indica que, en condiciones fisiológicas, las subunidades individuales se asocian de manera no covalente para producir una estructura trimérica. Dicha proteína de fusión inhibió de manera significativa la capacidad de las CE para migrar en respuesta a factores de crecimiento, así como su capacidad para formar CLS. Asimismo, dicha proteína de fusión fue procesada *in vitro* por diferentes proteasas. Los datos muestran que la catepsina L, la elastasa pancreática y diversas MMPs, generaban tanto monómeros de ES como *trimerbodies*. Además, la proteína de fusión se procesó correctamente cuando era secretada por células tumorales productoras de MMPs, pero no cuando era producida por células que no producían MMPs. En ensayos *in vivo*, la secreción *in situ* de la proteína de fusión originó una inhibición significativa del crecimiento tumoral.

Estos resultados abren una vía para el desarrollo de estrategias de terapia antitumoral utilizando este tipo de proteínas de fusión, las cuales forman parte de una nueva generación de inhibidores de angiogénesis útiles como agentes terapéuticos para tratar enfermedades asociadas a desequilibrios en dicha angiogénesis.

## CONCLUSIONES

“Matar a un hombre es algo muy duro, le quitas todo lo que tiene y todo lo que podría tener”

Sin Perdón

*The unforgiven*

(Director: Clint Eastwood; Guión: David Webb Peoples)

- I. La fusión de los dominios I/II de la proteína III del bacteriófago, con anticuerpos recombinantes en formato monocadena tiene un efecto positivo sobre la estabilidad y funcionalidad del anticuerpo.
- II. Células eucarióticas modificadas genéticamente son capaces de secretar proteínas de fusión formadas por un anticuerpo recombinante en formato monocadena y el dominio I de la proteína III. La administración por vía intramuscular de una vacuna de ADN desnudo, que codifica una proteína de fusión de estas características, es capaz de inducir una respuesta inmune específica tipo Th1.
- III. Mediante la fusión de la región de trimerización del dominio NC1 del colágeno XVIII con un anticuerpo recombinante en formato monocadena, es posible generar un nuevo tipo de anticuerpo multivalente, que hemos denominado *trimerbody*. El *trimerbody* tiene una masa molecular de ~110 kDa, lo que indica que, en condiciones fisiológicas, las subunidades individuales se asocian de manera no covalente para producir una estructura trimérica.
- IV. Estos anticuerpos multivalentes pueden ser secretados, por células humanas genéticamente modificadas, en forma funcionalmente activa, tanto en formato monoespecífico como multiespecífico.
- V. El *trimerbody* es muy estable y presenta una afinidad funcional 100 veces superior a la de un anticuerpo recombinante en formato monocadena monovalente.
- VI. En ensayos *in vivo* el *trimerbody* demostró excelentes propiedades para la localización tumoral.
- VII. Mediante la fusión del dominio NC1 del colágeno XVIII con un anticuerpo recombinante en formato monocadena con actividad antiangiogénica (scFv L36-NC1<sup>ES+</sup>), es posible generar un nuevo tipo de agente antiangiogénico multivalente y multifuncional.
- VIII. La proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> es secretada, por células humanas genéticamente modificadas, en forma funcionalmente activa y con una masa molecular aproximada de 210 kDa, lo que indica que, en condiciones fisiológicas, las subunidades individuales se asocian de manera no covalente para producir una estructura trimérica. La proteína de fusión puede ser procesada *in vitro* por diferentes proteasas, generando monómeros de endostatina y anticuerpos triméricos.

- IX. La proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> inhibió de manera significativa la capacidad de células endoteliales de migrar en respuesta a factores de crecimiento y para formar estructuras capilariformes.
- X. En ensayos *in vivo*, la secreción *in situ* de la proteína de fusión scFv L36-NC1<sup>ES+</sup> originó una inhibición significativa del crecimiento tumoral.

**BIBLIOGRAFÍA**

“Siempre imaginé que la crónica de mi vida, si acaso alguna vez llegaba a escribirla, tendría una primera frase excelente: algo lírico, como «Lolita, luz de mi vida, fuego de mis entrañas», de Nabokov; y, si no me salía nada lírico, algo arrollador, como «Todas las familias felices se asemejan, pero cada familia desdichada es desdichada a su manera», de Tolstói. La gente recuerda estas palabras incluso cuando ya ha olvidado todo lo demás que hay en el libro. En lo tocante a frases de apertura, al mejor, a mi modo de ver, es el comienzo de *El buen soldado*, de Ford Madox Ford: «Éste es el relato más triste que nunca he oído.» Docenas de veces lo habré leído, y sigue dejándome patidifuso.”

Firmin. Aventuras de una alimaña urbana  
*Firmin: Adventures of a Metropolitan Lowlife*  
(Sam Savage)



1. Abdollahi, A., Hahnfeldt, P., Maercker, C., Grone, H.J., Debus, J., Ansorge, W., Folkman, J., Hlatky, L. y Huber, P.E. *Endostatin's antiangiogenic signaling network* (2004) *Mol. Cell.* 13, 649-663
2. Adams, G.P., McCartney, J.E., Tai, M.S., Oppermann, H., Huston, J.S., Stafford, W.F., III, Bookman, M.A., Fand, I., Houston, L.L. y Weiner, L.M. *Highly specific in vivo tumor targeting by monovalent and divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv* (1993) *Cancer Res.* 53, 4026-4034
3. Adams, G.P., McCartney, J.E., Wolf, E.J., Eisenberg, J., Tai, M.S., Huston, J.S., Stafford, W.F., III, Bookman, M.A., Houston, L.L. y Weiner, L.M. *Optimization of in vivo tumor targeting in SCID mice with divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv: effects of dose escalation and repeated i.v. administration* (1995) *Cancer Immunol. Immunother.* 40, 299-306
4. Adams, G.P. y Weiner, L.M. *Monoclonal antibody therapy of cancer* (2005) *Nat. Biotechnol.* 23, 1147-1157
5. Afanasieva, T.A., Wittmer, M., Vitaliti, A., Ajmo, M., Neri, D. y Klemenz, R. *Single-chain antibody and its derivatives directed against vascular endothelial growth factor: application for antiangiogenic gene therapy* (2003) *Gene Ther.* 10, 1850-1859
6. Alvarez, R.D., Barnes, M.N., Gomez-Navarro, J., Wang, M., Strong, T.V., Arafat, W., Arani, R.B., Johnson, M.R., Roberts, B.L., Siegal, G.P. y Curiel, D.T. *A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial* (2000) *Clin. Cancer Res.* 6, 3081-3087
7. Alvarez-Vallina, L. *Genetic approaches for antigen-selective cell therapy* (2001) *Curr. Gene Ther.* 1, 385-397
8. Alvarez-Vallina, L. *Ingeniería de anticuerpos*. En "*Anticuerpos Monoclonales. Realidades y Perspectivas*" (2004) Alvarez-Vallina, L., editor. Editorial Complutense, Madrid
9. Apostolopoulos, V., Pietersz, G.A. y McKenzie, I.F. *Cell-mediated immune responses to MUC1 fusion protein coupled to mannan* (1996) *Vaccine.* 14, 930-938
10. Bach, H., Mazor, Y., Shaky, S., Shoham-Lev, A., Berdichevsky, Y., Gutnick, D.L. y Benhar, I. *Escherichia coli maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies* (2001) *J. Mol. Biol.* 312, 79-93
11. Beckman, R.A., Weiner, L.M. y Davis, H.M. *Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors* (2007) *Cancer* 109, 170-179
12. Bendandi, M., Gocke, C.D., Kobrin, C.B., Benko, F.A., Sternas, L.A., Pennington, R., Watson, T.M., Reynolds, C.W., Gause, B.L., Duffey, P.L., Jaffe, E.S., Creekmore, S.P., Longo, D.L. y Kwak, L.W. *Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma* (1999) *Nat. Med.* 5, 1171-1177
13. Berd, D., Maguire, H.C., Jr., McCue, P. y Mastrangelo, M.J. *Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients* (1990) *J. Clin. Oncol.* 8, 1858-1867

14. Beresford, G.W., Pavlinkova, G., Booth, B.J., Batra, S.K. y Colcher, D. *Binding characteristics and tumor targeting of a covalently linked divalent CC49 single-chain antibody* (1999) *Int. J. Cancer.* 81, 911-917
15. Berger, M., Shankar, V. y Vafai, A. *Therapeutic applications of monoclonal antibodies* (2002) *Am. J. Med. Sci.* 324, 14-30
16. Bergers, G. y Hanahan, D. *Modes of resistance to anti-angiogenic therapy* (2008) *Nat. Rev. Cancer.* 8, 592-603
17. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. y Bourne, P.E. *The Protein Data Bank* (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242
18. Birchler, M., Neri, G., Tarli, L., Halin, C., Viti, F. y Neri, D. *Infrared photodetection for the in vivo localisation of phage-derived antibodies directed against angiogenic markers* (1999) *J. Immunol. Methods* 231, 239-248
19. Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. y Whitlow, M. *Single-chain antigen-binding proteins* (1988) *Science* 242, 423-426
20. Blanco, B., Holliger, P., Vile, R.G. y Alvarez-Vallina, L. *Induction of human T lymphocyte cytotoxicity and inhibition of tumor growth by tumor-specific diabody-based molecules secreted from gene-modified bystander cells* (2003) *J. Immunol.* 171, 1070-1077
21. Boder, E.T. y Wittrup, K.D. *Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries* (1997) *Nat. Biotechnol.* 15, 553-557
22. Boehm, T., Folkman, J., Browder, T. y O'Reilly, M.S. *Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance* (1997) *Nature.* 390, 404-407
23. Borsi, L., Balza, E., Bestagno, M., Castellani, P., Carnemolla, B., Biro, A., Leprini, A., Sepulveda, J., Burrone, O., Neri, D. y Zardi, L. *Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin* (2002) *Int. J. Cancer.* 102, 75-85
24. Borsi, L., Balza, E., Carnemolla, B., Sassi, F., Castellani, P., Berndt, A., Kosmehl, H., Biro, A., Siri, A., Orecchia, P., Grassi, J., Neri, D. y Zardi, L. *Selective targeted delivery of TNFalpha to tumor blood vessels* (2003) *Blood.* 102, 4384-4392
25. Boulianne, G.L., Hozumi, N. y Shulman, M.J. *Production of functional chimaeric mouse/human antibody* (1984) *Nature* 312, 643-646
26. Brekke, O.H. y Sandlie, I. *Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century* (2003) *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 52-62
27. Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S.H., Lee, B. y Pastan, I. *A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 7538-7542
28. Bruggemann, M. y Neuberger, M.S. *Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice* (1996) *Immunol. Today* 17, 391-397

29. Burnet, F.M. *Immunological aspects of malignant disease* (1967) *Lancet*. 1, 1171-1174
30. Cohen, P.A., Mani, J.C. y Lane, D.P. *Characterization of a new intrabody directed against the N-terminal region of human p53* (1998) *Oncogene*. 17, 2445-2456
31. Cumbers, S.J., Williams, G.T., Davies, S.L., Grenfell, R.L., Takeda, S., Batista, F.D., Sale, J.E. y Neuberger, M.S. *Generation and iterative affinity maturation of antibodies in vitro using hypermutating B-cell lines* (2002) *Nat. Biotechnol.* 20, 1129-1134
32. Darrah, P.A., Patel, D.T., De Luca, P.M., Lindsay, R.W., Davey, D.F., Flynn, B.J., Hoff, S.T., Andersen, P., Reed, S.G., Morris, S.L., Roederer, M. y Seder, R.A. *Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major* (2007) *Nat. Med.* 13, 843-850
33. de Haard, H.J., van, N.N., Reurs, A., Hufton, S.E., Roovers, R.C., Henderikx, P., de Bruine, A.P., Arends, J.W. y Hoogenboom, H.R. *A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies* (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 18218-18230
34. Desplancq, D., King, D.J., Lawson, A.D. y Mountain, A. *Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3* (1994) *Protein Eng.* 7, 1027-1033
35. Deyev, S.M., Waibel, R., Lebedenko, E.N., Schubiger, A.P. y Pluckthun, A. *Design of multivalent complexes using the barnase\*barstar module* (2003) *Nat. Biotechnol.* 21, 1486-1492
36. di, G.C., Li, P., Riggs, P.D. y Inouye, H. *Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein* (1988) *Gene*. 67, 21-30
37. Dolezal, O., De, G.R., Walter, M., Doughty, L., Hattarki, M., Hudson, P.J. y Kortt, A.A. *Single-chain Fv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: the residue at position 15 in the V(L) domain of the scFv-0 (V(L)-V(H)) molecule is primarily responsible for formation of a tetramer-trimer equilibrium* (2003) *Protein Eng* 16, 47-56
38. Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Shiver, J.W. y Liu, M.A. *DNA vaccines* (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15, 617-648
39. Edelman, G.M. *Dissociation of gamma-globulin* (1959) *Journal of the American Chemical Society* 81, 3155-3156
40. Edelman, G.M. *Antibody structure and molecular immunology* (1991) *Scand. J. Immunol.* 34, 1-22
41. Edelweiss, E., Balandin, T.G., Ivanova, J.L., Lutsenko, G.V., Leonova, O.G., Popenko, V.I., Sapozhnikov, A.M. y Deyev, S.M. *Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells* (2008) *PLoS. ONE*. 3, e2434
42. Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. y Schindler, D.G. *Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 720-724

43. Fagraeus, A. *Antibody production in relation to the development of plasma cells* (1948) Stockholm University
44. Fan, C.Y., Huang, C.C., Chiu, W.C., Lai, C.C., Liou, G.G., Li, H.C. y Chou, M.Y. *Production of multivalent protein binders using a self-trimerizing collagen-like peptide scaffold* (2008) FASEB J. 22, 3795-3804
45. Ferrera, F., La, C.A., Rizzi, M., Hahn, B.H., Indiveri, F. y Filaci, G. *Gene vaccination for the induction of immune tolerance* (2007) Ann. N. Y. Acad. Sci. 1110, 99-111
46. Fiser, A. y Sali, A. *Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models* (2003) Methods Enzymol. 374, 461-491
47. Folberg, R. y Maniotis, A.J. *Vasculogenic mimicry* (2004) APMIS. 112, 508-525
48. Folkman, J. *Endogenous angiogenesis inhibitors* (2004) APMIS. 112, 496-507
49. Forrer, P. y Jaussi, R. *High-level expression of soluble heterologous proteins in the cytoplasm of Escherichia coli by fusion to the bacteriophage lambda head protein D* (1998) Gene. 224, 45-52
50. Furuta, M., Uchikawa, M., Ueda, Y., Yabe, T., Taima, T., Tsumoto, K., Kojima, S., Juji, T. y Kumagai, I. *Construction of mono- and bivalent human single-chain Fv fragments against the D antigen in the Rh blood group: multimerization effect on cell agglutination and application to blood typing* (1998) Protein Eng. 11, 233-241
51. Gallucci, S., Lolkema, M. y Matzinger, P. *Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells* (1999) Nat. Med. 5, 1249-1255
52. Gertrudis Rojas, Nelson Santiago Vispo y Jorge V Gabilondo *Tecnología de bibliotecas combinatorias de fagos filamentosos para producir anticuerpos humanos in vitro*. En "Anticuerpos Monoclonales. Realidades y Perspectivas" (2004) Alvarez-Vallina, L., editor. Editorial Complutense, Madrid
53. Giambernardi, T.A., Grant, G.M., Taylor, G.P., Hay, R.J., Maher, V.M., McCormick, J.J. y Klebe, R.J. *Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells* (1998) Matrix Biol. 16, 483-496
54. Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I. y Pluckthun, A. *A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments* (1990) Biochemistry 29, 1362-1367
55. Goel, A., Colcher, D., Baranowska-Kortylewicz, J., Augustine, S., Booth, B.J., Pavlinkova, G. y Batra, S.K. *Genetically engineered tetravalent single-chain Fv of the pancreatic carcinoma monoclonal antibody CC49: improved biodistribution and potential for therapeutic application* (2000) Cancer Res. 60, 6964-6971
56. Gorman, S.D. y Clark, M.R. *Humanisation of monoclonal antibodies for therapy* (1990) Semin. Immunol. 2, 457-466
57. Grant, G.M., Giambernardi, T.A., Grant, A.M. y Klebe, R.J. *Overview of expression of matrix metalloproteinases (MMP-17, MMP-18, and MMP-20) in cultured human cells I* (1999) Matrix Biol. 18, 145-148
58. Greenberger, P.A. *Immunotherapy update: mechanisms of action* (2002) Allergy Asthma Proc. 23, 373-376

59. Griep, R.A., van, T.C., Kerschbaumer, R.J., Harper, K., Torrance, L., Himmeler, G., van der Wolf, J.M. y Schots, A. *pSKAP/S: An expression vector for the production of single-chain Fv alkaline phosphatase fusion proteins* (1999) *Protein Expr. Purif.* 16, 63-69
60. Griffin, M.D., Holman, P.O., Tang, Q., Ashourian, N., Korthauer, U., Kranz, D.M. y Bluestone, J.A. *Development and applications of surface-linked single chain antibodies against T-cell antigens* (2001) *J. Immunol. Methods* 248, 77-90
61. Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J. y . *Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires I* (1994) *EMBO J.* 13, 3245-3260
62. Gurunathan, S., Wu, C.Y., Freidag, B.L. y Seder, R.A. *DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity* (2000) *Curr. Opin. Immunol.* 12, 442-447
63. Gussow, D. y Seemann, G. *Humanization of monoclonal antibodies* (1991) *Methods Enzymol.* 203:99-121., 99-121
64. Halin, C., Gafner, V., Villani, M.E., Borsi, L., Berndt, A., Kosmehl, H., Zardi, L. y Neri, D. *Synergistic therapeutic effects of a tumor targeting antibody fragment, fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor alpha* (2003) *Cancer Res.* 63, 3202-3210
65. Hanes, J. y Pluckthun, A. *In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 4937-4942
66. Hayhurst, A. *Improved expression characteristics of single-chain Fv fragments when fused downstream of the Escherichia coli maltose-binding protein or upstream of a single immunoglobulin-constant domain* (2000) *Protein Expr. Purif.* 18, 1-10
67. Hefta, L.J., Chen, F.S., Ronk, M., Sauter, S.L., Sarin, V., Oikawa, S., Nakazato, H., Hefta, S. y Shively, J.E. *Expression of carcinoembryonic antigen and its predicted immunoglobulin-like domains in HeLa cells for epitope analysis* (1992) *Cancer Res.* 52, 5647-5655
68. Hess, A.R., Margaryan, N.V., Seftor, E.A. y Hendrix, M.J. *Deciphering the signaling events that promote melanoma tumor cell vasculogenic mimicry and their link to embryonic vasculogenesis: role of the Eph receptors* (2007) *Dev. Dyn.* 236, 3283-3296
69. Hill, D.F. y Petersen, G.B. *Nucleotide sequence of bacteriophage *φ*1 DNA* (1982) *J. Virol.* 44, 32-46
70. Holliger, P., Brissinck, J., Williams, R.L., Thielemans, K. y Winter, G. *Specific killing of lymphoma cells by cytotoxic T-cells mediated by a bispecific diabody* (1996) *Protein Eng.* 9, 299-305
71. Holliger, P. y Hudson, P.J. *Engineered antibody fragments and the rise of single domains* (2005) *Nat. Biotechnol.* 23, 1126-1136
72. Holliger, P., Prospero, T. y Winter, G. *"Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 6444-6448
73. Holliger, P., Riechmann, L. y Williams, R.L. *Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage *φ*d at 1.9 Å: evidence for conformational lability* (1999) *J. Mol. Biol.* 288, 649-657

74. Hoogenboom, H.R. *Selecting and screening recombinant antibody libraries* (2005) Nat. Biotechnol. 23, 1105-1116
75. Hoogenboom, H.R., Marks, J.D., Griffiths, A.D. y Winter, G. *Building antibodies from their genes* (1992) Immunol. Rev. 130, 41-68
76. Hozumi, N. y Tonegawa, S. *Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions* (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 3628-3632
77. Hu, S., Shively, L., Raubitschek, A., Sherman, M., Williams, L.E., Wong, J.Y., Shively, J.E. y Wu, A.M. *Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts* (1996) Cancer Res. 56, 3055-3061
78. Hudson, P.J. y Kortt, A.A. *High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies* (1999) J. Immunol. Methods 231, 177-189
79. Hudson, P.J. y Souriau, C. *Engineered antibodies* (2003) Nat. Med. 9, 129-134
80. Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Bruccoleri, R.E., Haber, E., Crea, R. y . *Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 85, 5879-5883
81. Ikeda, H., Chamoto, K., Tsuji, T., Suzuki, Y., Wakita, D., Takeshima, T. y Nishimura, T. *The critical role of type-I innate and acquired immunity in tumor immunotherapy* (2004) Cancer Sci. 95, 697-703
82. Iliades, P., Kortt, A.A. y Hudson, P.J. *Triabodies: single chain Fv fragments without a linker form trivalent trimers* (1997) FEBS Lett. 409, 437-441
83. Jagadish, M.N., Edwards, S.J., Hayden, M.B., Grusovin, J., Vandenberg, K., Schoofs, P., Hamilton, R.C., Shukla, D.D., Kalnins, H., McNamara, M., Haynes, J., Nisbet, I.T., Ward, C.W. y Pye, D. *Chimeric potyvirus-like particles as vaccine carriers* (1996) Intervirology. 39, 85-92
84. Jendreyko, N., Popkov, M., Beerli, R.R., Chung, J., McGavern, D.B., Rader, C. y Barbas, C.F., III *Intradiabodies, bispecific, tetravalent antibodies for the simultaneous functional knockout of two cell surface receptors* (2003) J. Biol. Chem. 278, 47812-47819
85. Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S. y Winter, G. *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse* (1986) Nature 321, 522-525
86. José Yélamos *Mecanismos de generación de la diversidad de anticuerpos*. En "Anticuerpos Monoclonales. Realidades y Perspectivas" (2004) Alvarez-Vallina, L., editor. Editorial Complutense, Madrid
87. Jung, S. y Pluckthun, A. *Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting* (1997) Protein Eng. 10, 959-966
88. Khare, P.D., Liao, S., Hirose, Y., Kuroki, M., Fujimura, S., Yamauchi, Y., Miyajima-Uchida, H. y Kuroki, M. *Tumor growth suppression by a retroviral vector displaying*

- scFv antibody to CEA and carrying the iNOS gene* (2002) *Anticancer Res.* 22, 2443-2446
89. Kim, S.J., Park, Y. y Hong, H.J. *Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies* (2005) *Mol. Cells.* 20, 17-29
  90. King, C.A., Spellerberg, M.B., Zhu, D., Rice, J., Sahota, S.S., Thompson, A.R., Hamblin, T.J., Radl, J. y Stevenson, F.K. *DNA vaccines with single-chain Fv fused to fragment C of tetanus toxin induce protective immunity against lymphoma and myeloma* (1998) *Nat. Med.* 4, 1281-1286
  91. Kipriyanov, S.M., Little, M., Kropshofer, H., Breitling, F., Gotter, S. y Dubel, S. *Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion* (1996) *Protein Eng.* 9, 203-211
  92. Kipriyanov, S.M., Moldenhauer, G., Schuhmacher, J., Cochlovius, B., Von der Lieth, C.W., Matys, E.R. y Little, M. *Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics* (1999) *J. Mol. Biol.* 293, 41-56
  93. Klee, G.G. *Human anti-mouse antibodies* (2000) *Arch. Pathol. Lab Med.* 124, 921-923
  94. Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A. y Virnekas, B. *Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides* (2000) *J. Mol. Biol.* 296, 57-86
  95. Knappik, A., Krebber, C. y Pluckthun, A. *The effect of folding catalysts on the in vivo folding process of different antibody fragments expressed in Escherichia coli* (1993) *Biotechnology (N. Y.)* 11, 77-83
  96. Knappik, A. y Pluckthun, A. *Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding* (1995) *Protein Eng* 8, 81-89
  97. Kohler, G. y Milstein, C. *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity* (1975) *Nature* 256, 495-497
  98. Krauss, J., Arndt, M.A., Vu, B.K., Newton, D.L., Seeber, S. y Rybak, S.M. *Efficient killing of CD22+ tumor cells by a humanized diabody-RNase fusion protein* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 595-602
  99. Kuo, C.J., LaMontagne, K.R., Jr., Garcia-Cardena, G., Ackley, B.D., Kalman, D., Park, S., Christofferson, R., Kamihara, J., Ding, Y.H., Lo, K.M., Gillies, S., Folkman, J., Mulligan, R.C. y Javaherian, K. *Oligomerization-dependent regulation of motility and morphogenesis by the collagen XVIII NCI/endostatin domain* (2001) *J. Cell Biol.* 152, 1233-1246
  100. Kwak, L.W., Taub, D.D., Duffey, P.L., Bensinger, W.I., Bryant, E.M., Reynolds, C.W. y Longo, D.L. *Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunised marrow donor* (1995) *Lancet.* 345, 1016-1020
  101. Landsteiner, K. (1945) *The specificity of serological reactions*, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts
  102. Laue T *Conservation of signal: a new algorithm for the elimination of the reference concentration as an independently variable parameter in the analysis of sedimentation*

- equilibrium*. En "*Ultracentrifugation in biochemistry and polymer science*" (1992) Harding SE, Rowe AJ y Horton JC, editors. Royal Society of Chemistry, Cambridge
103. Lawrence, L.J., Kortt, A.A., Iliades, P., Tulloch, P.A. y Hudson, P.J. *Orientation of antigen binding sites in dimeric and trimeric single chain Fv antibody fragments* (1998) FEBS Lett. 425, 479-484
  104. Lobato, M.N. y Rabbitts, T.H. *Intracellular antibodies as specific reagents for functional ablation: future therapeutic molecules* (2004) Curr. Mol. Med. 4, 519-528
  105. Lu, D., Jimenez, X., Zhang, H., Atkins, A., Brennan, L., Balderes, P., Bohlen, P., Witte, L. y Zhu, Z. *Di-diabody: a novel tetravalent bispecific antibody molecule by design* (2003) J. Immunol. Methods. 279, 219-232
  106. Lubkowski, J., Hennecke, F., Pluckthun, A. y Wlodawer, A. *The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of g3p* (1998) Nat. Struct. Biol. 5, 140-147
  107. Martineau, P., Jones, P. y Winter, G. *Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm* (1998) J. Mol. Biol. 280, 117-127
  108. Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. y Dower, W.J. *An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91, 9022-9026
  109. McGuinness, B.T., Walter, G., FitzGerald, K., Schuler, P., Mahoney, W., Duncan, A.R. y Hoogenboom, H.R. *Phage diabody repertoires for selection of large numbers of bispecific antibody fragments* (1996) Nat. Biotechnol. 14, 1149-1154
  110. McInerney, T.L., Brennan, F.R., Jones, T.D. y Dimmock, N.J. *Analysis of the ability of five adjuvants to enhance immune responses to a chimeric plant virus displaying an HIV-1 peptide* (1999) Vaccine. 17, 1359-1368
  111. Milstein, C. y Cuello, A.C. *Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry* (1983) Nature. 305, 537-540
  112. Minton AP *Conservation of signal: a new algorithm for the elimination of the reference concentration as an independently variable parameter in the analysis of sedimentation equilibrium*. En "*Modern analytical ultracentrifugation*" (1994) Schuster T y Laue T, editors. Birkhauser Boston Inc, Cambridge
  113. Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A. y Oi, V.T. *Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 81, 6851-6855
  114. Mosmann, T.R. y Sad, S. *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more* (1996) Immunol. Today 17, 138-146
  115. Muller, D., Karle, A., Meissburger, B., Hofig, I., Stork, R. y Kontermann, R.E. *Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin* (2007) J. Biol. Chem. 282, 12650-12660
  116. Neuberger, M.S. *Novartis Medal Lecture. Antibodies: a paradigm for the evolution of molecular recognition* (2002) Biochem. Soc. Trans. 30, 341-350



117. Nishimura, T. y Ohta, A. *A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice* (1999) J. Immunol. 162, 6503-6509
118. Ntziachristos, V., Bremer, C. y Weissleder, R. *Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging* (2003) Eur. Radiol. 13, 195-208
119. O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. y Folkman, J. *Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth* (1997) Cell. 88, 277-285
120. O'Shea, E.K., Rutkowski, R. y Kim, P.S. *Evidence that the leucine zipper is a coiled coil* (1989) Science. 243, 538-542
121. O'Shea, E.K., Rutkowski, R., Stafford, W.F., III y Kim, P.S. *Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun* (1989) Science. 245, 646-648
122. Odegrip, R., Coomber, D., Eldridge, B., Hederer, R., Kuhlman, P.A., Ullman, C., FitzGerald, K. y McGregor, D. *CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 2806-2810
123. Oh, S.P., Kamagata, Y., Muragaki, Y., Timmons, S., Ooshima, A. y Olsen, B.R. *Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 4229-4233
124. Olafsen, T., Cheung, C.W., Yazaki, P.J., Li, L., Sundaresan, G., Gambhir, S.S., Sherman, M.A., Williams, L.E., Shively, J.E., Raubitschek, A.A. y Wu, A.M. *Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications* (2004) Protein Eng Des Sel. 17, 21-27
125. Pack, P. y Pluckthun, A. *Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in Escherichia coli* (1992) Biochemistry. 31, 1579-1584
126. Padlan, E.A. *A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties* (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498
127. Pieper, U., Eswar, N., Braberg, H., Madhusudhan, M.S., Davis, F.P., Stuart, A.C., Mirkovic, N., Rossi, A., Marti-Renom, M.A., Fiser, A., Webb, B., Greenblatt, D., Huang, C.C., Ferrin, T.E. y Sali, A. *MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources* (2004) Nucleic Acids Res. 32, D217-D222
128. Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., Neri, P. y Neri, D. *Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel* (1998) J. Biol. Chem. 273, 21769-21776
129. PORTER, R.R. *The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain* (1959) Biochem. J. 73:119-26., 119-126
130. Rajpal, A. y Turi, T.G. *Intracellular stability of anti-caspase-3 intrabodies determines efficacy in retargeting the antigen* (2001) J. Biol. Chem. 276, 33139-33146

131. Rao, J., Dragulescu-Andrasi, A. y Yao, H. *Fluorescence imaging in vivo: recent advances* (2007) Curr. Opin. Biotechnol. 18, 17-25
132. Reiche, N., Jung, A., Brabletz, T., Vater, T., Kirchner, T. y Faller, G. *Generation and characterization of human monoclonal scFv antibodies against Helicobacter pylori antigens* (2002) Infect. Immun. 70, 4158-4164
133. Reiersen, H., Lobersli, I., Loset, G.A., Hvattum, E., Simonsen, B., Stacy, J.E., McGregor, D., FitzGerald, K., Welschhof, M., Brekke, O.H. y Marvik, O.J. *Covalent antibody display--an in vitro antibody-DNA library selection system* (2005) Nucleic Acids Res. 33, e10
134. Reth, M., Imanishi-Kari, T. y Rajewsky, K. *Analysis of the repertoire of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies in C 57 BL/6 mice by cell fusion. II. Characterization of idiotopes by monoclonal anti-idiotope antibodies* (1979) Eur. J. Immunol. 9, 1004-1013
135. Rheinhecker, M., Hardt, C., Ilag, L.L., Kufer, P., Gruber, R., Hoess, A., Lupas, A., Rottenberger, C., Pluckthun, A. y Pack, P. *Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen* (1996) J. Immunol. 157, 2989-2997
136. Richarme, G. y Caldas, T.D. *Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins* (1997) J. Biol. Chem. 272, 15607-15612
137. Ridgway, J.B., Presta, L.G. y Carter, P. *'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization* (1996) Protein Eng 9, 617-621
138. Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. y Winter, G. *Reshaping human antibodies for therapy* (1988) Nature. 332, 323-327
139. Roman, M., Martin-Orozco, E., Goodman, J.S., Nguyen, M.D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R.S., Richman, D.D., Carson, D.A. y Raz, E. *Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants* (1997) Nat. Med. 3, 849-854
140. Rossi, E.A., Goldenberg, D.M., Cardillo, T.M., McBride, W.J., Sharkey, R.M. y Chang, C.H. *Stably tethered multifunctional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting* (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 6841-6846
141. Rudbach, J.A., Cantrell, J.L. y Ulrich, J.T. *Methods of immunization to enhance the immune response to specific antigens in vivo in preparation for fusions yielding monoclonal antibodies* (1995) Methods Mol. Biol. 45, 1-8
142. Sacks, D. y Anderson, C. *Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of Leishmania infection in mice* (2004) Immunol. Rev. 201:225-38., 225-238
143. Sambrook, J. and Russell, D. W. (2006) *The condensed protocols from Molecular cloning: a laboratory manual*, 2 Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
144. Sanchez, L., Ayala, M., Freyre, F., Pedroso, I., Bell, H., Falcon, V. y Gavilondo, J.V. *High cytoplasmic expression in E. coli, purification, and in vitro refolding of a single chain Fv antibody fragment against the hepatitis B surface antigen* (1999) J. Biotechnol. 72, 13-20

145. Sanz, L., Blanco, B. y Alvarez-Vallina, L. *Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks* (2004) Trends Immunol. 25, 85-91
146. Sanz, L., Blanco, B. y Alvarez-Vallina, L. *Terapias con anticuerpos monoclonales: estado actual y nuevas perspectivas*. En "Anticuerpos Monoclonales. Realidades y Perspectivas" (2004) Alvarez-Vallina, L., editor. Editorial Complutense, Madrid
147. Sanz, L., Garcia-Bermejo, L., Blanco, F.J., Kristensen, P., Feijoo, M., Suarez, E., Blanco, B. y Álvarez-Vallina, L. *A novel cell binding site in the coiled-coil domain of laminin involved in capillary morphogenesis* (2003) EMBO J. 22, 1508-1517
148. Sanz, L., Kristensen, P., Blanco, B., Facticeau, S., Russell, S.J., Winter, G. y Alvarez-Vallina, L. *Single-chain antibody-based gene therapy: inhibition of tumor growth by in situ production of phage-derived human antibody fragments blocking functionally active sites of cell-associated matrices* (2002) Gene Ther. 9, 1049-1053
149. Sanz, L., Pascual, M., Munoz, A., Gonzalez, M.A., Salvador, C.H. y Álvarez-Vallina, L. *Development of a computer-assisted high-throughput screening platform for anti-angiogenic testing* (2002) Microvasc. Res. 63, 335-339
150. Sasaki, T., Fassler, R. y Hohenester, E. *Laminin: the crux of basement membrane assembly* (2004) J. Cell Biol. 164, 959-963
151. Sasaki, T., Fukai, N., Mann, K., Gohring, W., Olsen, B.R. y Timpl, R. *Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin* (1998) EMBO J. 17, 4249-4256
152. Sasaki, T., Hohenester, E. y Timpl, R. *Structure and function of collagen-derived endostatin inhibitors of angiogenesis* (2002) IUBMB. Life. 53, 77-84
153. Savelyeva, N., Munday, R., Spellerberg, M.B., Lomonosoff, G.P. y Stevenson, F.K. *Plant viral genes in DNA idiotype vaccines activate linked CD4+ T-cell mediated immunity against B-cell malignancies* (2001) Nat. Biotechnol. 19, 760-764
154. Schuck, P. *Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling* (2000) Biophys. J. 78, 1606-1619
155. Shahied, L.S., Tang, Y., Alpaugh, R.K., Somer, R., Greenspon, D. y Weiner, L.M. *Bispecific minibodies targeting HER2/neu and CD16 exhibit improved tumor lysis when placed in a divalent tumor antigen binding format* (2004) J. Biol. Chem. 279, 53907-53914
156. Sharkey, R.M., McBride, W.J., Karacay, H., Chang, K., Griffiths, G.L., Hansen, H.J. y Goldenberg, D.M. *A universal pretargeting system for cancer detection and therapy using bispecific antibody* (2003) Cancer Res. 63, 354-363
157. Smith, G.P. *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface* (1985) Science 228, 1315-1317
158. Soderlind, E., Duenas, M. y Borrebaeck, C.A. *Chaperonins in phage display of antibody fragments* (1995) Methods Mol. Biol. 51:343-53., 343-353
159. Soderlind, E., Strandberg, L., Jirholt, P., Kobayashi, N., Alexeiva, V., Aberg, A.M., Nilsson, A., Jansson, B., Ohlin, M., Wingren, C., Danielsson, L., Carlsson, R. y Borrebaeck, C.A. *Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries* (2000) Nat. Biotechnol. 18, 852-856

160. Specthrie, L., Bullitt, E., Horiuchi, K., Model, P., Russel, M. y Makowski, L. *Construction of a microphage variant of filamentous bacteriophage* (1992) *J. Mol. Biol.* 228, 720-724
161. Stevenson, F.K., Zhu, D., King, C.A., Ashworth, L.J., Kumar, S. y Hawkins, R.E. *Idiotypic DNA vaccines against B-cell lymphoma* (1995) *Immunol. Rev.* 145, 211-228
162. Susana Magadán y África González Fernández *Generación de anticuerpos monoclonales in vivo*. En "*Anticuerpos Monoclonales. Realidades y Perspectivas*" (2004) Alvarez-Vallina, L., editor. Editorial Complutense, Madrid
163. Tan, P., Mitchell, D.A., Buss, T.N., Holmes, M.A., Anasetti, C. y Foote, J. *"Superhumanized" antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28* (2002) *J. Immunol.* 169, 1119-1125
164. Ulmer, J.B., Wahren, B. y Liu, M.A. *Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances* (2006) *Trends Mol. Med.* 12, 216-222
165. Urban, J.H., Schneider, R.M., Compte, M., Finger, C., Cichutek, K., Álvarez-Vallina, L. y Buchholz, C.J. *Selection of functional human antibodies from retroviral display libraries* (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, e35
166. van der, S.D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E. y Berendsen, H.J. *GROMACS: fast, flexible, and free* (2005) *J. Comput. Chem.* 26, 1701-1718
167. Verhoeyen, M., Milstein, C. y Winter, G. *Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity* (1988) *Science* 239, 1534-1536
168. Verma, R., Boleti, E. y George, A.J. *Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems* (1998) *J. Immunol. Methods.* 216, 165-181
169. Vermeulen, P.B., Gasparini, G., Fox, S.B., Colpaert, C., Marson, L.P., Gion, M., Belien, J.A., de Waal, R.M., Van, M.E., Magnani, E., Weidner, N., Harris, A.L. y Dirix, L.Y. *Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours* (2002) *Eur. J. Cancer.* 38, 1564-1579
170. Visintin, M., Quondam, M. y Cattaneo, A. *The intracellular antibody capture technology: towards the high-throughput selection of functional intracellular antibodies for target validation* (2004) *Methods.* 34, 200-214
171. Wallack, M.K., Sivanandham, M., Ditaranto, K., Shaw, P., Balch, C.M., Urist, M.M., Bland, K.I., Murray, D., Robinson, W.A., Flaherty, L., Richards, J.M., Rosen, L. y Bartolucci, A.A. *Increased survival of patients treated with a vaccinia melanoma oncolysate vaccine: second interim analysis of data from a phase III, multi-institutional trial* (1997) *Ann. Surg.* 226, 198-206
172. Wilkinson, D.L. y Harrison, R.G. *Predicting the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli* (1991) *Biotechnology (N. Y. )*. 9, 443-448
173. Wilson, D.S., Keefe, A.D. y Szostak, J.W. *The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3750-3755

174. Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. y Hoogenboom, H.R. *Making antibodies by phage display technology* (1994) Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455
175. Winter, G. y Harris, W.J. *Humanized antibodies* (1993) Immunol. Today 14, 243-246
176. Yang, K., Basu, A., Wang, M., Chintala, R., Hsieh, M.C., Liu, S., Hua, J., Zhang, Z., Zhou, J., Li, M., Phyu, H., Petti, G., Mendez, M., Janjua, H., Peng, P., Longley, C., Borowski, V., Mehlig, M. y Filpula, D. *Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation* (2003) Protein Eng. 16, 761-770
177. Zauderer M (2002) US Patent. Application number 20.020.123.057A1
178. Zhang, J., Tanha, J., Hiram, T., Khieu, N.H., To, R., Tong-Sevinc, H., Stone, E., Brisson, J.R. y MacKenzie, C.R. *Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents* (2004) J. Mol. Biol. 335, 49-56
179. Zhou, H. y Zhou, Y. *Distance-scaled, finite ideal-gas reference state improves structure-derived potentials of mean force for structure selection and stability prediction* (2002) Protein Sci. 11, 2714-2726
180. Zhu, Z., Zapata, G., Shalaby, R., Snedecor, B., Chen, H. y Carter, P. *High level secretion of a humanized bispecific diabody from Escherichia coli* (1996) Biotechnology (N. Y. ). 14, 192-196

## **ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS**

Durante el desarrollo de esta Investigación se han generado una serie de resultados que han sido recogidos en una serie de artículos, cuyas referencias a aparecen aquí indicadas. Aquellas publicaciones que están directamente relacionadas y forman parte de esta Tesis Doctoral, aparecen completos a continuación.

Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Sanz L, Bonet J, Compte M, et al. *In Vivo Tumor Targeting and Imaging with Engineered Trivalent Antibody Fragments Containing Collagen-Derived Sequences* (2009) PLoS ONE, 4(4): e5381. doi:10.1371/journal.pone.0005381.

Sanz L, Cuesta AM, Salas C, Corbacho C, Bellas C, Alvarez-Vallina L. *Differential transplantability of human endothelial cells in colorectal cancer and renal cell carcinoma primary xenografts* (2009) Lab Invest. , Jan;89(1):91-7.

Compte M, Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Camino VA, Vicario JL, Sanz L, Alvarez-Vallina L. *Tumor immunotherapy using gene-modified human mesenchymal stem cells loaded into synthetic extracellular matrix scaffolds* (2008) Stem Cells, Dec 18 (PMID 19096041).

Sanz L, Santos-Valle P, Alonso-Camino V, Salas C, Serrano A, Vicario JL, Cuesta AM, Compte M, Sánchez-Martín D, Alvarez-Vallina L. *Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels* (2008) Microvasc Res., Apr;75(3):308-14.

Compte M, Blanco B, Serrano F, Cuesta AM, Sanz L, Bernad A, Holliger P, Alvarez-Vallina L. *Inhibition of tumor growth in vivo by in situ secretion of bispecific anti-CEA x anti-CD3 diabodies from lentivirally transduced human lymphocytes* (2007) Cancer Gene Ther. Apr;14(4):380-8.

Sánchez-Arévalo Lobo VJ, Cuesta AM\*, Sanz L, Compte M, García P, Prieto J, Blanco FJ, Alvarez-Vallina L. *Enhanced antiangiogenic therapy with antibody-collagen XVIII NC1 domain fusion proteins engineered to exploit matrix remodeling events* (2006) Int J Cancer. Jul 15;119(2):455-62.

Cuesta AM\*, Suárez E, Larsen M, Jensen KB, Sanz L, Compte M, Kristensen P, Alvarez-Vallina L. *Enhancement of DNA vaccine potency through linkage of antigen to filamentous bacteriophage coat protein III domain I* (2006) Immunology. Apr;117(4):502-6.

Sanz L, Cuesta AM, Compte M, Alvarez-Vallina L. *Antibody engineering: facing new challenges in cancer therapy* (2005) Acta Pharmacol Sin. Jun;26(6):641-8.

\*Coautor del trabajo publicado

# In Vivo Tumor Targeting and Imaging with Engineered Trivalent Antibody Fragments Containing Collagen-Derived Sequences

Ángel M. Cuesta<sup>1</sup>, David Sánchez-Martín<sup>1</sup>, Laura Sanz<sup>1</sup>, Jaume Bonet<sup>2</sup>, Marta Compte<sup>1</sup>, Leonor Kremer<sup>3</sup>, Francisco J. Blanco<sup>4</sup>, Baldomero Oliva<sup>2</sup>, Luis Álvarez-Vallina<sup>1\*</sup>

**1** Molecular Immunology Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain, **2** Structural Bioinformatics' Lab, Biomedical Informatics Research Unit, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Protein Tools Unit, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, **4** Structural Biology Unit, CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia, Bizkaia, Spain

## Abstract

There is an urgent need to develop new and effective agents for cancer targeting. In this work, a multivalent antibody is characterized *in vivo* in living animals. The antibody, termed "trimerbody", comprises a single-chain antibody (scFv) fragment connected to the N-terminal trimerization subdomain of collagen XVIII NC1 by a flexible linker. As indicated by computer graphic modeling, the trimerbody has a tripod-shaped structure with three highly flexible scFv heads radially outward oriented. Trimerbodies are trimeric in solution and exhibited multivalent binding, which provides them with at least a 100-fold increase in functional affinity than the monovalent scFv. Our results also demonstrate the feasibility of producing functional bispecific trimerbodies, which concurrently bind two different ligands. A trimerbody specific for the carcinoembryonic antigen (CEA), a classic tumor-associated antigen, showed efficient tumor targeting after systemic administration in mice bearing CEA-positive tumors. Importantly, a trimerbody that recognizes an angiogenesis-associated laminin epitope, showed excellent tumor localization in several cancer types, including fibrosarcomas and carcinomas. These results illustrate the potential of this new antibody format for imaging and therapeutic applications, and suggest that some laminin epitopes might be universal targets for cancer targeting.

**Citation:** Cuesta ÁM, Sánchez-Martín D, Sanz L, Bonet J, Compte M, et al. (2009) *In Vivo* Tumor Targeting and Imaging with Engineered Trivalent Antibody Fragments Containing Collagen-Derived Sequences. PLoS ONE 4(4): e5381. doi:10.1371/journal.pone.0005381

**Editor:** Christophe Egles, Tufts University, United States of America

**Received:** January 28, 2009; **Accepted:** March 27, 2009; **Published:** April 29, 2009

**Copyright:** © 2009 Cuesta et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Grants BIO2005-04794 and BIO2008-03233 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (www.micinn.es), and S-BIO-0236-2006 from the Comunidad Autónoma de Madrid (www.madrid.org), and the Fundación Genoma España to L.A.-V.; Grant P061621 from the Fondo de Investigación Sanitaria (www.isciii.es) to L.S. F.J.B. acknowledges Ikerbasque for financial support. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: lalvarezv.hpth@salud.madrid.org

## Introduction

An optimized antibody fragment designed for targeting cancer *in vivo* should fulfill several requirements: high specificity and affinity for the target antigen, low immunogenicity; and be ready available form expression to purified protein [1]. The pharmacokinetic properties of the antibody should be adjusted depending on the intended use. Format and molecular weight of tumor targeting antibodies are critical factors that influence their pharmacokinetics. Intact IgG molecules (150 kDa) display low blood clearance and incomplete tumor penetration. On the other hand, small monovalent single-chain variable fragments (scFv) (25–30 kDa) are more effective in tumor penetration but they are cleared too rapidly and have poor tumor retention because of their binding properties [2].

The ideal tumor-targeting antibodies are intermediate-sized multivalent molecules, which provide rapid tissue penetration, high target retention and rapid blood clearance. Recent biodistribution studies [3] indicate that bivalent antibodies such as diabodies (60 kDa), and minibodies (80 kDa) may be best suited for tumor imaging and therapy due to a higher total tumor uptake and better tumor-to-blood ratios than intact IgG molecules.

Diabodies are non-covalent dimeric molecules spontaneously formed in scFv with short linkers connecting the variable region genes [4,5]. Another useful format derived from scFv, with expanded half-life but still rapid, high-level uptake into tumors is the minibody, which results from the fusion of scFv with the IgG1 CH3 domain, which provokes dimerization [6].

However, despite of the good results obtained with these engineered formats in various models [3,7–12], there are still some limitations that need to be dealt with in order to take full advantage of the targeting capability of these recombinant antibodies. One of these drawbacks is their relatively limited flexibility, and the necessity of the second antigen to be precisely oriented and located in a strictly defined area once the antibody binds the first antigen [13,14]. Therefore, bound antigens should be almost opposed in the diabody, and in a small circular area in the minibody, which actually precludes the binding to the second antigen in a number of situations. This implies that part of the increased affinity observed relies mainly on binding/rebinding, and not on simultaneous binding to different molecules of the antigen. To circumvent these drawbacks we have developed a new class of multivalent antibodies. These antibodies, termed "trimerbodies", use the N-terminal association subdomain of collagen

XVIII NC1, responsible for the non-covalent trimerization of collagen alpha chains, to drive multimerization [15].

Until now, most of the tumor targeting agents have focused on tumor-associated cell surface markers, such as the carcinoembryonic antigen (CEA). The CEA is a heavily glycosylated cell adhesion molecule that is widely used as marker for colorectal, stomach, pancreas, breast, and lung carcinomas; and several other carcinomas of epithelial origin [16]. However, molecules, which are selectively expressed in the stroma and in angiogenesis-active sites, appear to be particularly suited for antibody-based strategies for targeting solid tumors. During tumor progression, the extracellular matrix suffers extensive remodeling through deposition of new components and proteolytic degradation, giving rise to unique epitopes not usually accessible in homeostatic organs [17].

In the present study, we characterized the binding affinity *in vitro* and the *in vivo* tumor targeting properties of trimerbodies with specificity for human CEA, and an angiogenesis-associated laminin epitope. A trimerbody with specificity for the hapten NIP (4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenyl) was used as control. All the purified trimerbodies exhibited excellent antigen binding capacity and were multivalent, which provides them with a significant increase in functional affinity. Fluorescently labeled anti-CEA trimerbodies showed efficient tumor targeting of colorectal carcinomas in mice, and importantly, anti-laminin trimerbodies showed excellent tumor localization in several cancer types, including fibrosarcomas and carcinomas. These results illustrate the potential of this novel antibody format for imaging and therapeutic applications.

## Materials and Methods

### Antibodies and Reactives

The monoclonal antibodies (mAbs) used included 9E10 (Abcam, Cambridge, UK) specific for human c-myc, and NCRC23 (AbD Serotec, Kidlington, UK) specific for human CEA. The polyclonal antibodies, a rabbit anti-bovine serum albumin (BSA), a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG, and an HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Fc specific) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Laminin extracted from the Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse tumor was from Becton Dickinson Labware (Bedford, MA, USA). Human CEA and BSA were from Sigma-Aldrich. BSA was conjugated with 4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenyl (NIP) (Sigma-Aldrich) in a molar ratio of 10: 1 (NIP<sub>10</sub>-BSA) as described [18].

### Cells and culture conditions

HEK-293 cells (human embryo kidney epithelia; CRL-1573), and its derivative 293T cells (CRL-11268), HT-1080 (human fibrosarcoma; CCL-121), MKN45 cells (human stomach adenocarcinoma; JCRB-0254), and HeLa cells (human cervix carcinoma; CCL-2) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated Fetal Calf Serum (FCS) (all from Invitrogen, Carlsbad, CA) referred as to DMEM complete medium (DCM). HeLa<sup>CEA</sup> cells [19] were grown in DCM supplemented with 750 µg/ml G418 (Invitrogen).

### Construction of expression vectors

pCR3.1-L36 and pCR3.1-L36-NC1<sup>ES</sup> expression vectors were constructed as described [17,20]. The plasmid pVOM1.C23 containing the MFE-23 (anti-human CEA) scFv gene was kindly provided by Dr. R. E. Hawkins (University of Manchester, UK). The MFE-23 expression cassette was subcloned as HindIII-NotI into the vector pCEP4.6xHis-myc [20], resulting in pCEP4-MFE-23. Plasmid pCEP4-B1.8 containing the B1.8 (anti-hapten NIP)

scFv gene and the polyhistidine and c-myc epitopes was constructed as described [20]. To construct the plasmids pCEP4-MFE-23-NC1<sup>ES</sup> and pCEP4-B1.8-NC1<sup>ES</sup> the 252 bp NotI fragment derived from the plasmid pCR3.1-L36-NC1<sup>ES</sup> was ligated into the NotI digested backbone of plasmids pCEP4-MFE-23 or pCEP4-B1.8 respectively.

### Cell transfections and purification of recombinant antibodies

HEK-293 or 293T cells were transfected with the appropriate expression vectors, using Superfect (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). To generate stable cell lines, pCR3.1-L36, and pCR3.1-L36-NC1<sup>ES</sup> transfected HEK-293 cells were selected in DCM with 500 µg/ml G418; pCEP4-MFE-23-NC1<sup>ES</sup> and pCEP4-B1.8-NC1<sup>ES</sup> transfected HEK-293 cells were selected in DCM with 150 µg/ml hygromycin B (Invitrogen). Supernatants from transient and stable transfected cell populations were analyzed for protein expression by ELISA, SDS-PAGE and Western blotting using anti-myc mAb. Stable transfected HEK-293 cells were used to collect serum-free conditioned media medium (~1 liter) was concentrated (×10) with a 10,000 MWCO Vivaflow 50 filter (Vivascience AG, Hannover, Germany), dialyzed against PBS (pH 7.4) and loaded onto a HisTrap HP 1 ml column using an ÄKTA Prime plus system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The purified antibodies were dialyzed against PBS, analyzed by SDS-PAGE under nonreducing or reducing conditions, and stored at −20°C.

### Analytical gel filtration chromatography

Experiments were performed at room temperature with an ÄKTA FPLC system (GE Healthcare) using a Superdex 200 10/300GL column in PBS. Samples of 100 µl at a concentration of 0.5–1.0 mg/ml were injected and eluted at a flow rate of 0.5 ml/min. The column was calibrated with blue dextran (excluded volume) and molecular weight markers from 16 to 655 kDa (GE Healthcare).

### ELISA

The ability of purified trimerbodies (L36, MFE23, or B1.8) to bind murine laminin, human CEA, or NIP<sub>10</sub>-BSA conjugates was studied by ELISA as described [21]. The multivalence of trimerbody molecules was studied by ELISA using supernatant from single (pCR3.1-L36-NC1<sup>ES</sup> or pCEP4-B1.8-NC1<sup>ES</sup>) and double (pCR3.1-L36-NC1<sup>ES</sup> and pCEP4-B1.8-NC1<sup>ES</sup>) transfected 293T cells. Maxisorp (NUNC Brand Products, Roskilde, Denmark) plates were coated with laminin (0.5 µg/well), and after washing and blocking with 200 µl 5% non-fat dry milk in PBS, 100 µl of supernatant from single or double transfected 293T cells were added for 1 hour at room temperature. After three washes, 100 µl of NIP<sub>10</sub>-BSA (10 µg/ml) were added for 1 hour at room temperature. After three washes, 100 µl of rabbit anti-BSA antibody (1:1000) in 0.05% Tween-20-PBS were added for 1 hour at room temperature. After three more washes 100 µl of HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG were added for 1 hour at room temperature, after which the plate was washed and developed.

### Flow Cytometry

The expression of CEA on HeLa, and HeLa<sup>CEA</sup> cells and the binding of recombinant antibodies was studied as described [22]. Briefly, cells were incubated with anti-CEA mAb (5 µg/ml) or purified trimerbodies (anti-NIP or anti-CEA, 10 µg/ml) and mAb 9E10 (4 µg/ml) in 100 µl for 45 min. After washing, the cells were treated with appropriate dilutions of FITC-conjugated goat anti-



mouse IgG (Sigma-Aldrich). The samples were analyzed with an EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA).

### Surface plasmon resonance analysis

Analyses were performed at room temperature using a BIAcore 3000 (GE Healthcare). CM5 dextran sensor chips (GE Healthcare) were used in all analyses, with HBS-EP running buffer (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20), which was filtered with a 0.22  $\mu$ m filter and degassed before use. Proteins were dissolved in 10 mM sodium acetate, pH 4.5. NIP<sub>10</sub>-BSA was directly immobilized on the sensor chip surface as recommended in the BIAapplications Handbook (GE Healthcare), in independent flow cells at approximately 100, 1800 and 8500 resonance units (RU). BSA was immobilized at 1900 on reference flow cell. After each experiment, surfaces were regenerated with 30 mM HCl, allowing resonance signals to return to baseline values. Analyses were performed in duplicate.

For kinetic analyses, a flow cell with small amounts of immobilized NIP<sub>10</sub>-BSA (~100 RU) was used to minimize mass transport effects and rebinding. Individual samples consisting of purified scFv or trimerbody were passed over the chip surface at a flow rate of 20  $\mu$ l/min and association/dissociation was measured. Bulk refractive index changes were removed by subtracting the reference flow cell responses; the average response of a blank injection was also subtracted from all sensorgrams. Data were analyzed using BIAevaluation v4.1 software provided with the biosensor, and kinetic data were fitted to the Langmuir 1:1 interaction model.

### Molecular Modeling

The structure of the binding domain (L36 scFv) was modeled by comparative modeling [23] using as template the structure of 2GHW.B from the Protein Data Bank (PDB) [24]. This template was obtained with blast [25] e-value 2e-79 and a 70% of identity. The structure of the N-terminal trimerization domain of murine collagen XVIII NC1 was obtained from ModBase [26]. Both domains were linked by a 21 amino acid long peptide forming the L36 trimerbody monomer. The coordinates of the other two monomers were obtained applying a three-fold rotation axis symmetry. The trimer was formed by merging the coordinates of the three monomers. The structure of the trimer was optimized with GROMACS [27] and its energy was evaluated with DFIRE [28]. In order to compare the values of DFIRE between the monomer and the trimer, the energies were normalized dividing them by the length of the sequence.

### Serum stability

To determine whether trimerbody constructs remained functional in serum, five hundred nanograms of purified L36 trimerbody were incubated in 12.5% mouse serum from BALB/c mice (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) at 37°C for up to 72 h. Samples were removed for analysis at 3 h, 24 h, and 72 h following the start of incubation and frozen until the entire study was completed. As a control, a second set of serum-exposed samples was frozen immediately to represent a zero time point. Trimerbodies were then tested for their capability to retain functional binding to murine laminin by ELISA.

### Antibody labeling with cyanine 5

Purified L36 scFv and trimerbodies were labeled with cyanine 5 (Cy5) NHS esters (GE Healthcare) according to the manufacturer's recommendations. Cy5-labeled recombinant antibodies were separated from unincorporated Cy5 dye by gel-filtration on

Sephadex G25-M (PD-10 Columns, GE Healthcare), and concentrated in 10,000 MWCO Vivaspın 500 filter (Vivascience) to approximately 1 mg/ml. The labeling ratio of Cy5 to antibody (Cy5:antibody) was calculated as described [29] and was close to 1:1. The functionality of Cy5-labeled antibodies was verified by ELISA against specific antigen.

### Infrared immunophotodetection in tumor-bearing mice

Wild-type MKN45, HT1080, or HeLa cells ( $1-2 \times 10^6$ ) were implanted subcutaneously (n = 4) into the dorsal space of 6-week-old female Hsd: Athymic Nude-Foxn1<sup>tm</sup> mice (Harlan Ibérica). Nodule dimensions were used to calculate tumor volume using the formula: width<sup>2</sup> × length × 0.52. When tumors reached an appropriate volume (0.2–0.4 cm<sup>3</sup>), mice were injected in the tail vein with 100  $\mu$ l Cy5-labeled antibody solution in PBS (5 mg/Kg). Mice were imaged using the high-resolution charge-coupled-device (CCD) cooled digital camera ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics France, Massy, France), and Wasabi software (Hamamatsu Photonics), under anesthesia. All mice were handled in accordance with the guidelines of the Hospital Universitario Puerta de Hierro Animal Care and Use Committee and performed in accordance with Spanish legislation.

## Results

### Design and Expression of Trimerbody Constructs

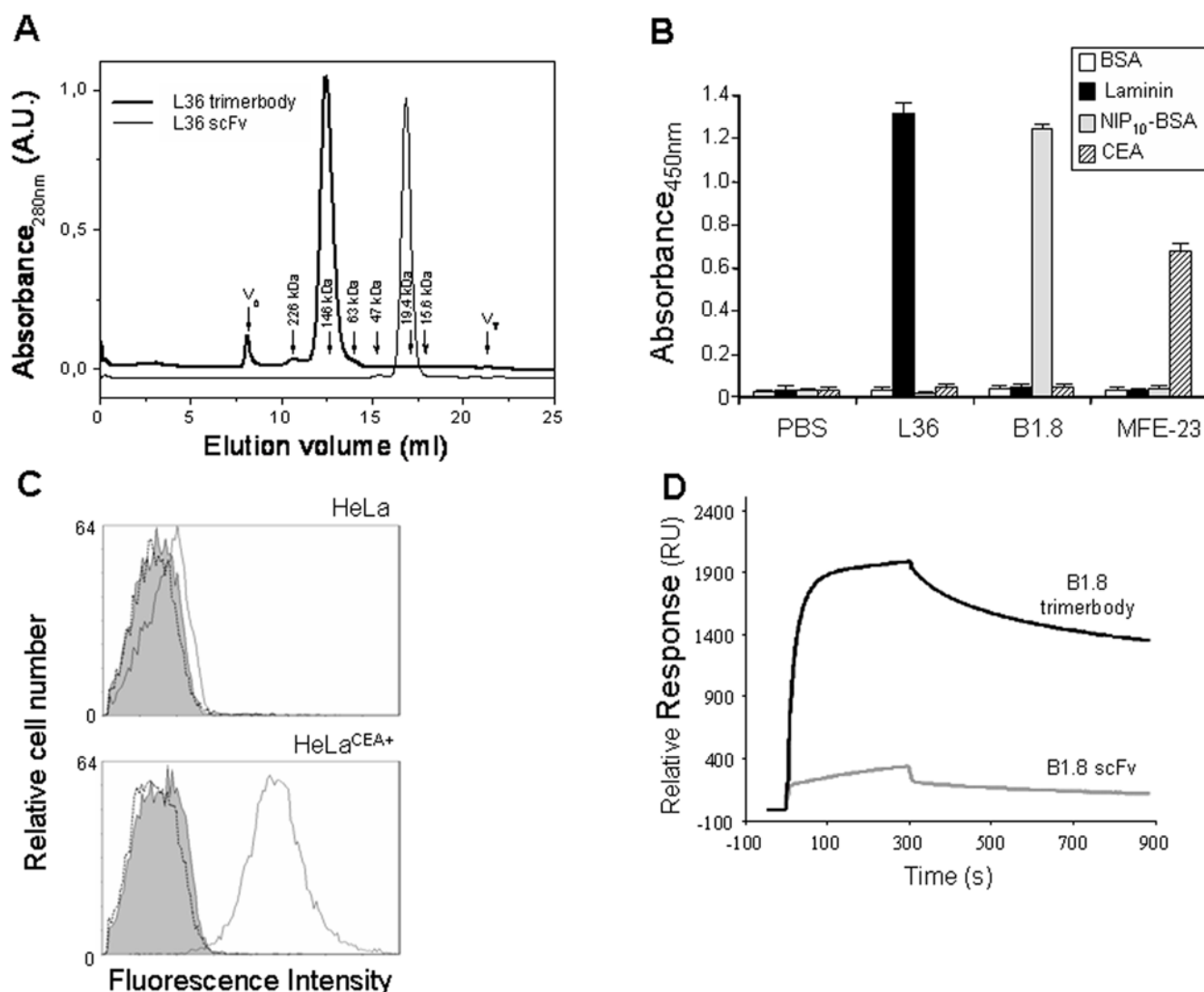
Structural analysis of the NC1 domain of collagen XVIII suggests that it consists of three segments, an N-terminal trimerization domain implicated in self-assembly of homotrimers; a central protease-sensitive hinge region; and the compact C-terminal endostatin domain [30]. We have previously shown that an engineered antibody containing the anti-laminin L36 scFv and the N-terminal trimerization domain of murine collagen XVIII NC1 was produced in human 293 cells in a functional active form [15]. To provide sufficient spatial flexibility to the N-terminal scFv a twenty-one amino acid artificial linker was used ([15], and Fig. S1).

The trimeric nature of the purified scFv-NC1 fusion was demonstrated by ultracentrifugation [15] and analytical gel filtration chromatography (Fig. 1A). The elution of L36 scFv in an analytical gel filtration shows that it is monomeric. The calibration of the column using the markers yields a molecular weight of 24.2 kDa, in good agreement with the theoretical one (26.9 kDa). By contrast, the elution of L36 scFv-NC1 fusion corresponds to an estimated MW of 109.3 kDa, indicating that it is a trimer (the theoretical mass of the trimer is 111.4 kDa), in agreement with the previously reported analysis by analytical ultracentrifugation [15]. This trimeric antibody format was designated “trimerbody”.

In this study, we have extended the concept by designing trimerbodies with specificity for the hapten NIP or CEA. The scFv genes derived from the anti-NIP B1.8 [18] and the anti-CEA MFE-23 [31] antibodies were similarly assembled and expressed as soluble secreted proteins in human HEK293 cells and purified from conditioned medium by immobilized metal affinity chromatography. The purification scheme yielded antibodies that were >95% pure by SDS-PAGE (data not shown). Both B1.8 and MFE-23 trimerbodies eluted from the column as single peaks (data not shown) comparable to that shown in Figure 1A.

### Antigen Binding Activity

The functionality of purified trimerbodies was demonstrated by ELISA against plastic immobilized NIP-BSA conjugates (NIP<sub>10</sub>-BSA), murine EHS laminin, and human CEA (Fig. 1B). Their ability to detect the antigen in a cellular context was investigated



**Figure 1. Molecular characterization of purified trimerbodies.** (A) Elution profile of the gel filtration experiment of L36 constructs (scFv and scFv-NC1 "trimerbody"). The exclusion ( $V_e$ ) and total ( $V_T$ ) volumes are indicated. The elution volumes of selected molecular weight markers are also indicated with arrows and the corresponding molecular weights. For the sake of clarity the absorbance of both chromatograms have been scaled and shifted in the figure. The functionality of purified trimerbodies was demonstrated by ELISA (B) against plastic immobilized BSA, murine EHS laminin, NIP-BSA conjugates (NIP<sub>10</sub>-BSA), and human CEA; and by flow cytometry analysis (C) on CEA-negative and CEA-positive tumor cells. Isotype control (filled histogram), anti-CEA trimerbody (solid line), and anti-NIP trimerbody (dotted line) are shown. (D) Analysis of B1.8 scFv and B1.8 trimerbody binding to NIP<sub>10</sub>-BSA using BIAcore. The curves showed data obtained after subtraction of the binding response to a BSA-coated reference surface (1900 RU), to remove the effects of non-specific binding. Representative sensorgrams corresponding to the adjusted binding curves of affinity-purified B1.8 scFv and B1.8 trimerbody (dil. 1200, and 800 nM) in buffer HBS-EP injected over the same two flow cells as above. Antibody samples and running buffer were injected over the surfaces (5 min, flow rate 20  $\mu$ l/min) and the dissociation phase was monitored for 8 min. doi:10.1371/journal.pone.0005381.g001

by immunofluorescence labeling of human tumor cells that express CEA on the cell surface. Fluorescence staining was observed after incubation with MFE-23 trimerbody, followed by reaction with anti-myc mAb and detection with FITC-conjugated goat anti-mouse antibodies. In contrast, incubation of CEA-positive cells with B1.8 trimerbody or incubation of CEA-negative HeLa cells with MFE-23 trimerbody revealed no staining (Fig. 1C). These results demonstrated that trimerbodies recognized not only immobilized antigen, but also native antigen on the surface of tumor cells.

Surface plasmon resonance (SPR) was used to determine the influence of the scFv and trimerbody formats on B1.8 antibody function. We compared the binding curves for each antibody format

using three different densities of NIP<sub>10</sub>-BSA covalently bound to the chip surface. Dextran-coupled BSA was used in a reference flow cell. To compare binding responses during association and dissociation, several concentrations of purified B1.8 antibodies were injected, ranging from 9 to 1,200 nM for B1.8 scFv and from 6 to 800 nM for B1.8 trimerbody onto the NIP<sub>10</sub>-BSA (1900 RU) surface (data not shown). In these conditions, only the trimerbody approached saturation of the antigen surface, whereas the scFv bound slowly and showed more rapid apparent dissociation. Sensorgrams indicated that the trimeric antibody has greater binding capacity than its monovalent counterpart (Fig. 1D).

For kinetic analyses, a flow cell coated with  $\sim$ 100 RU of NIP<sub>10</sub>-BSA was used. In these assays, the B1.8 scFv had a profile

considerably different from that of the B1.8 trimerbody, with slower association and faster dissociation rates. The kinetic rate constants for association ( $k_a$ ) and dissociation ( $k_d$ ) were determined by simultaneous fitting (global fitting) using the Langmuir 1:1 interaction model. For B1.8 scFv, the apparent association and dissociation rate constants were  $k_a$   $1.0 \times 10^4 \pm 1.7 \times 10^2$   $M^{-1} s^{-1}$  and  $k_d$   $2 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-5}$   $s^{-1}$  ( $\chi^2_0 = 0.189$ ). Using  $K_D = k_d/k_a$ , the equilibrium dissociation constant for B1.8 scFv was estimated as  $2 \times 10^{-7}$  M. Depending on the antibody concentration tested in each cycle, the trimerbody injected onto the low surface density of NIP<sub>10</sub>-BSA could probably bind both mono- and multivalently, and the apparent kinetic binding constants might include avidity effects of multivalent binding. Using a 1:1 interaction model in which association and dissociation phases were treated separately for each concentration, we also fitted the experimental results for trivalent B1.8 binding. Data from curves with resonance levels that approach  $R_{max}$  would be close to those obtained for monovalent binding. In this case, as the concentration of trimerbody B1.8 increased, the calculated  $k_a$  diminished from  $4 \times 10^5$   $M^{-1} s^{-1}$  (12.5 nM trimerbody) to  $2 \times 10^4$   $M^{-1} s^{-1}$  (800 nM trimerbody). These changes are compatible with changes in the proportion of antibody that binds the ligand mono- or multivalently, since approaching surface saturation leads to a larger proportion of

monovalent antibody binding. The apparent  $k_d$  had narrower range, from  $6 \times 10^{-4}$  (12.5 nM) to  $9 \times 10^{-4}$  (800 nM). Considering that at 12.5 nM, most of the trimerbody can bind bi- or multivalently, the functional affinity of the trimerbody calculated from this concentration could be  $K_D = 1.5 \times 10^{-9}$  M or higher.

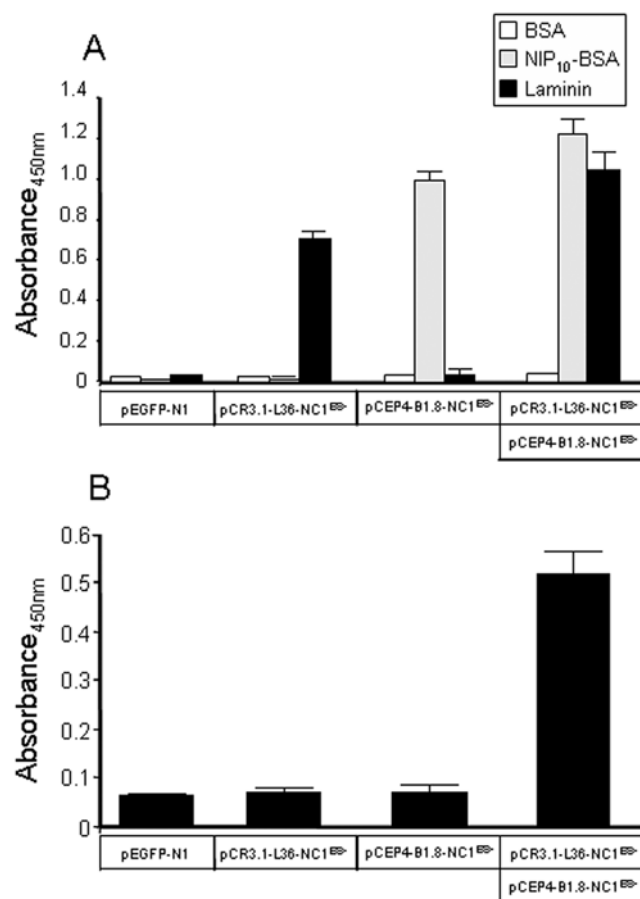
To further assess that at least two antigen-binding sites were located on the same trimerbody molecule, 293T cells were transfected with plasmid encoding L36 trimerbody, B1.8 trimerbody or cotransfected with both plasmids. Western blot analysis showed that the amount of trimerbody was higher in double-transfected than in single-transfected 293T cells (data not shown). Conditioned media from single-transfected 293T cells bound NIP<sub>10</sub>-BSA or laminin, whereas conditioned media from double-transfected 293T cells recognized both antigens (Fig. 2A). In sandwich ELISA, conditioned medium from double-transfected 293T was added to laminin-coated wells and, after washing, the laminin-bound trimerbodies were able to capture soluble NIP<sub>10</sub>-BSA (Fig. 2B). Trimerbodies in the supernatant from 293T cells single-transfected with plasmid encoding L36 trimerbody were shown to bind to laminin, but the bound trimerbody did not capture, in turn, NIP<sub>10</sub>-BSA.

### Stability *in vitro*

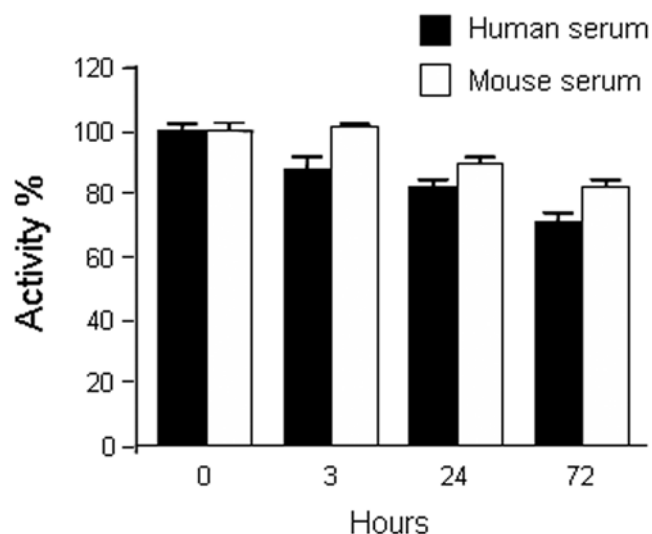
Testing the stability of engineered antibody fragments in serum is critical to determine their potential application *in vivo*. We therefore determined the functionality of L36 trimerbody after incubation in mouse and human serum at 37°C for prolonged periods of time. As shown in Fig. 3, L36 trimerbody retained 80–90% of its binding activity after 72 hours of incubation.

### Tumor Targeting

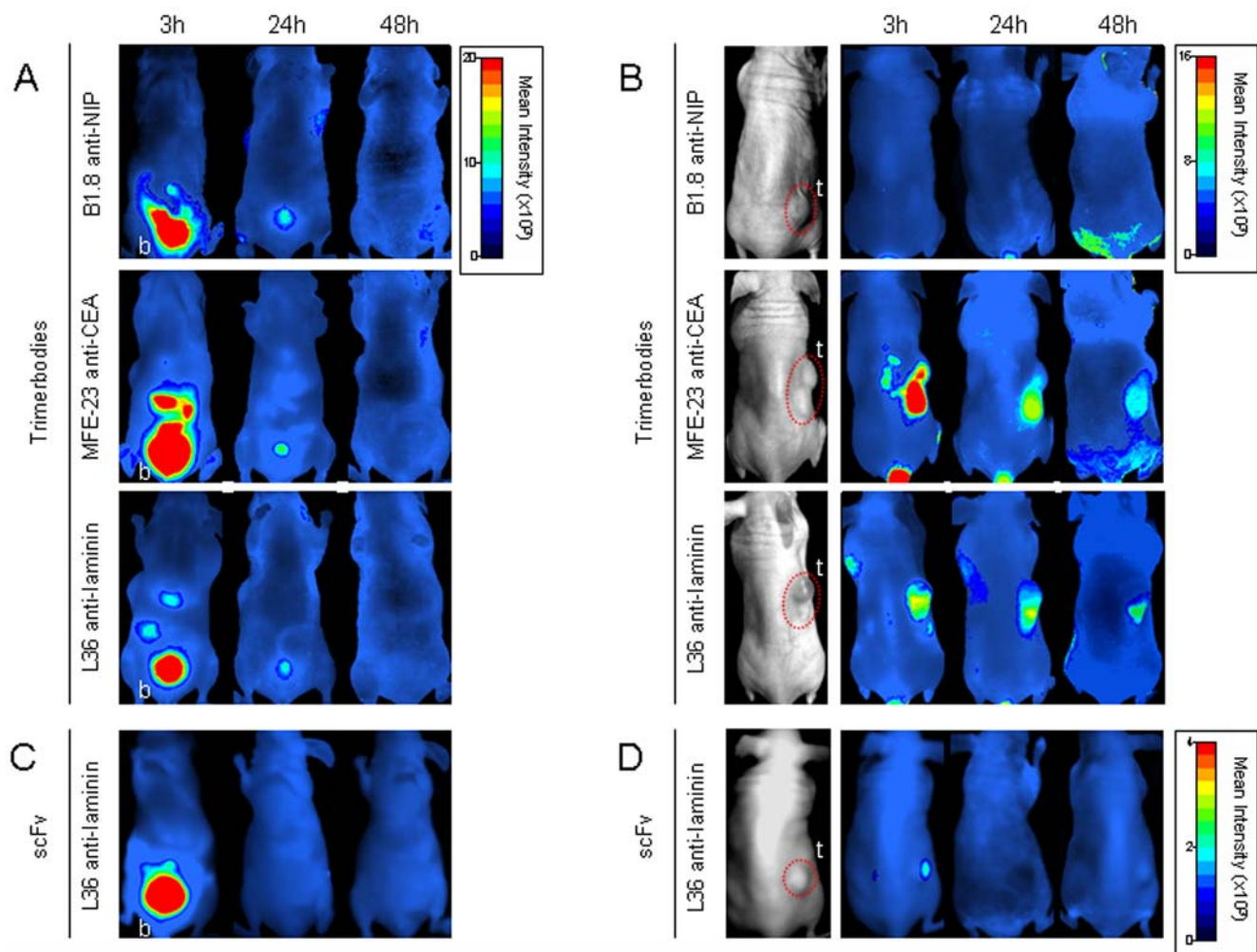
To evaluate the tissue distribution and tumor targeting of anti-NIP, anti-CEA and anti-laminin trimerbodies we used an optical molecular imaging system, which allows a kinetic evaluation of tumor targeting and antibody clearance in the same animal imaged at different time points. Trimerbodies were labeled with the near-infrared fluorochrome Cy5 and injected in the tail vein of nude mice bearing MKN45 (stomach adenocarcinoma), HT-1080



**Figure 2. Binding activities of monospecific and bispecific trimerbody molecules.** Supernatant from single-transfected [pEGFP-N1, pCR3.1-L36-NC1<sup>ES</sup>, or pCEP4-B1.8-NC1<sup>ES</sup>] 293T cells are compared with supernatant from double-transfected [pCR3.1-L36-NC1<sup>ES</sup> and pCEP4-B1.8-NC1<sup>ES</sup>] 293T cells by direct ELISA (A), using plates coated with BSA, NIP-BSA conjugates (NIP<sub>10</sub>-BSA), and murine EHS laminin; and by sandwich-ELISA (B) using plates coated with laminin. doi:10.1371/journal.pone.0005381.g002



**Figure 3. Serum stability of trimerbody molecules.** Purified L36 trimerbody was incubated in human or mouse serum at 37°C, as explained in material and methods, and the reaction mixtures were analyzed by ELISA. doi:10.1371/journal.pone.0005381.g003



**Figure 4. Targeting of fluorescently labeled antibodies to CEA-positive human tumor xenografts in nude mice.** Near-infrared fluorescence imaging of nude mice bearing dorsal subcutaneous (s.c.) MKN45 human gastric-carcinoma tumors. Ventral (A, C) and dorsal (B, D) imaging was performed at 3, 24, and 48 hours after intravenous (i.v.) injection with Cy5-labeled trimerbodies (A, B), or Cy5-labeled L36 scFv (C, D). b: bladder, t: tumor.

doi:10.1371/journal.pone.0005381.g004

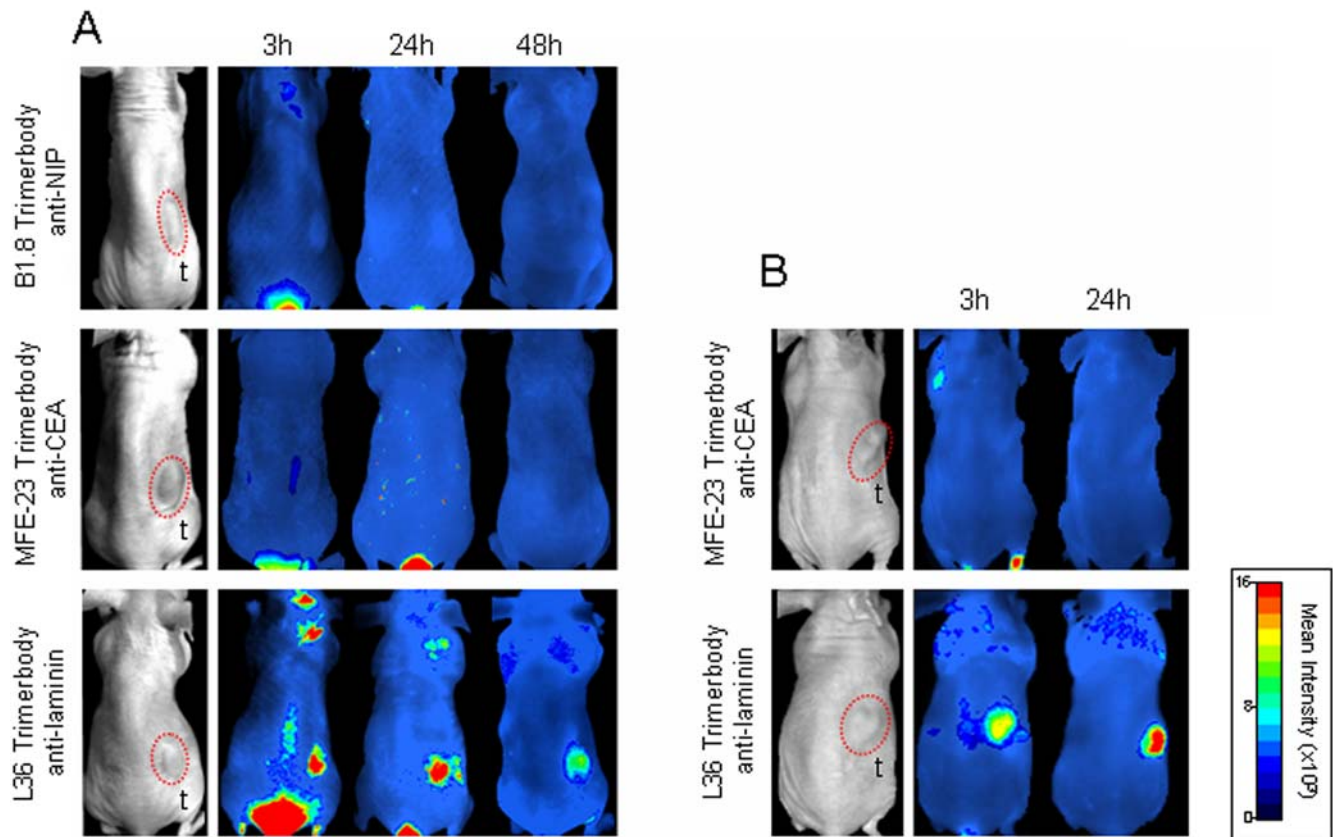
(fibrosarcoma), or HeLa (cervical adenocarcinoma) human xenografts ( $n = 4/\text{group}$ ). All trimerbodies showed a rapid renal clearance after i.v. injection, with peak signal intensity at 3 h and no detectable bladder signal at 48 h postinjection (Fig. 4A and C). Elimination of the L36-Cy5 scFv was even more rapid, and fluorescence was not detected in the bladder 24 hours after injection (Fig. 4C).

The control B1.8 trimerbody showed no detectable localization in any of the three tumor types studied (Fig. 4B and 5A). A strong and selective accumulation in CEA-positive tumors was observed in the case of the MFE-23 trimerbody. After i.v. injection of MFE23-Cy5 trimerbody, maximum tumor uptake was detected at 3 h, whereas the signal intensity decreased by 24 h and remained detectable for at least 48 h (Fig. 4B). The anti-laminin trimerbody showed localization in all the tumors studied, although the kinetics of signal onset differed from that observed with anti-CEA trimerbodies (Fig. 4B and 5). Maximum tumor uptake was at 24 h, which was lower than that of the MFE-23 trimerbody. The anti-laminin scFv also showed specific tumor uptake but at a much lower level than that of the anti-laminin trimerbody (Fig. 4B and 4D).

## Discussion

Our previous studies showed the ability of collagen-derived sequences to promote antibody trimerization [15]. We reported that fusion of the N-terminal association subdomain of collagen XVIII NC1, responsible for the non-covalent trimerization of collagen XVIII alpha chains, to the C-terminus of a scFv antibody confers a trimeric state to the fused antibody (“trimerbody”). Using a scFv (L36) that recognizes an angiogenesis-associated laminin epitope [21] and inhibits tumor angiogenesis and growth [20], we demonstrated that locally produced trimeric L36 was more effective than its monomeric counterparts in blocking capillary morphogenesis *in vitro*, and in preventing tumor growth *in vivo* [15]. Recently, another group [32] has used a similar approach to drive antibody multimerization. They demonstrated that a short collagen-like peptide scaffold was able to promote trimerization of fused scFv fragments (“collabody”).

In this study, we present the most comprehensive characterization to date (both *in vitro* and *in vivo*) of the antibody-NC1 fusion, and we extend the concept by making analogous molecules with specificity



**Figure 5. Targeting of fluorescently labeled trimerbodies to CEA negative human tumor xenografts in nude mice.** Near-infrared fluorescence imaging of nude mice bearing s.c. HT1080 human fibrosarcoma tumors (A) or HeLa human cervical adenocarcinoma tumors (B). Imaging was performed at 3, 24, and 48 hours after i.v. injection with Cy5-labeled trimerbodies.  
doi:10.1371/journal.pone.0005381.g005

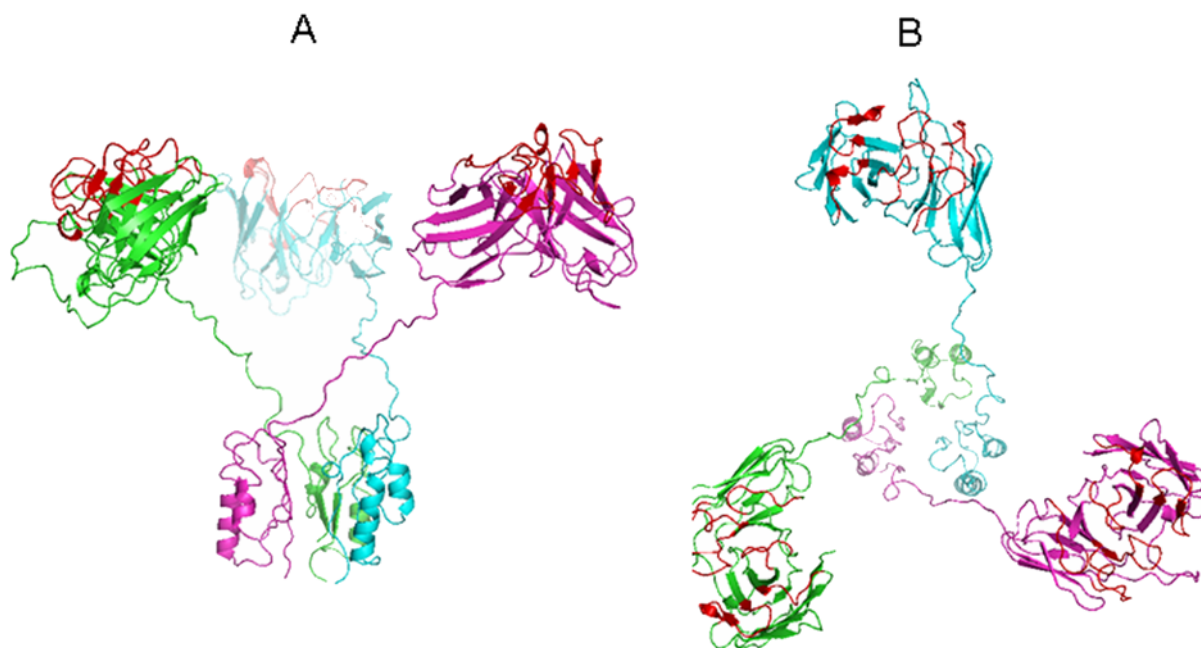
for the hapten NIP and the human tumor-associated antigen CEA. All the trimerbodies were isolated in functional active form from conditioned medium of transfected HEK293 cells and easily purified using immobilized metal affinity chromatography. Purified trimerbodies are trimeric in solution, and exhibit excellent antigen binding capacity and stability. Trimerbodies are very efficient recognizing antigen when immobilized, or associated to the tumor cell surface. SPR analysis demonstrated that the trimerbody had a higher binding signal than the monomeric antibody and apparently slower dissociation, consistent with multivalent binding to the antigen. We calculated that the anti-NIP trimerbody has at least a 100-fold increase in apparent functional affinity for NIP-BSA conjugates compared to its monovalent counterpart. This result suggests that this affinity gain might be conferred by avidity effects of a second combining site in the trimerbody molecule. The presence of at least two functional binding sites in one single trimerbody molecule was further demonstrated in bispecific trimerbodies. Stable bifunctional anti-laminin x anti-NIP trimerbodies were easily produced by the coexpression of two different trimerbody constructs in human cells.

The gain in affinity through avidity makes trimerbodies attractive for *in vivo* imaging as an alternative reagent to dimeric antibodies. It is tempting to speculate that trimerbodies will be preferred over dimeric antibodies (diabodies and minibodies), although this property may be dependent on the structure and density of the antigen recognized by the scFv modules. For full avidity in multivalent antibodies targeted to surface-bound molecules, the antigen binding sites must point out towards the same direction. If simultaneous multiple binding is not sterically

possible, then apparent gains in functional affinity are likely to be small and due only to the effect of increased rebinding, which is dependent on diffusion rates and surface antigen concentration [33]. Analysis of the trimerbody model suggests a tripod-shaped structure with the scFv domains outward oriented (Fig. 6). Flexibility between antigen binding sites is another important aspect in the design of multivalent antibodies required to cross-link surface receptors on either the same or adjacent cells [2]. The twenty-one residue linker, with a maximal length of 79.8 Å if the conformation is fully extended [34], is very flexible allowing numerous binding geometries. When an antigen-antibody interaction takes place the possibility of establishing a second interaction depends on the valence, orientation and flexibility of the antigen-binding site. Multiple binding can effectively reduce the off rates thereby increasing the retention time of the antibody bound to the target antigen. In this respect, a major advantage of trimerbody over other trimeric formats (e.g. collabody) is the flexibility. The more compact/rigid collabody structure reduces accessibility of the scFv modules [15], that is a critical parameter for tumor targeting *in vivo*.

Thus, multimerization of scFv constructs has advantages for *in vivo* applications. Multivalent recombinant antibodies, such as diabodies and minibodies have shown promise as *in vivo* targeting agents [2]. Trimerbodies are intermediate-sized, multivalent molecules that exhibit high stability under physiological conditions. The potential of trimerbody molecules for *in vivo* targeting was assessed in nude mice bearing human tumor xenografts. Anti-CEA trimerbody localized rapidly and specifically to CEA-positive





**Figure 6. Structural model of the anti-laminin L36 trimerbody.** Lateral (A) and superior view (B) of the molecular model of the anti-laminin L36 trimerbody. In this computer simulation, each monomer is colored differently (green, blue, and purple). The complementarity-determining regions (CDRs) are colored red.  
doi:10.1371/journal.pone.0005381.g006

tumor xenografts. The tumor uptake reached a maximum at 3 hours postinjection and slowly washed out over time. Fluorescence was still detectable in the tumor at 48 hours after trimerbody injection. Importantly, the anti-laminin L36 trimerbody localized in all the tumors studied independently of tumor type. Maximum tumor uptake of anti-laminin trimerbodies was at 24 h following administration. Although the anti-laminin L36 scFv showed specific tumor accumulation, the tumor uptake was limited, probably due to the rapid clearance from the blood pool (with half-lives less than 15 min) and its monovalent nature (involving low retention times) [35–38].

According to our previous results, the L36 epitope is located in the middle part of the rod-like portion of the laminin long arm, in a highly flexible area, which corresponds to a protease-susceptible site [39]. We have postulated that this epitope is only exposed during basement membrane (BM) assembly [39], where polymerizing intact laminin acts as a scaffold for the recruitment of other BM components [40]. The restricted expression of this epitope, to situations associated with BM remodeling, would explain the slower tumor uptake of L36 trimerbodies compared with trimerbodies targeting tumor-associated antigens, and the reduced renal uptake of L36 anti-laminin trimerbodies compared with other anti-laminin antibodies in the literature [41].

Beyond its diagnostic applications, trimerbodies offer promising therapeutic opportunities on the basis of the selective delivery of

bioactive molecules to the target tissue. Some of the immediate applications of trimerbodies specific for tumor-associated antigens (e.g. human epidermal growth factor receptor 2, prostate-specific antigen) or targeting tumor stroma (e.g., fibroblast activation protein) and neovasculature (e.g. VEGFR-2/KDR or fibronectin extra-domain B) include the development of fusion proteins with angiogenic inhibitors [15], cytokines, enzymes, or truncated receptors, and conjugation with radionuclides [42].

## Supporting Information

**Figure S1** Schematic structure of the scFv-NC1 gene (trimerbody).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005381.s001 (0.13 MB TIF)

## Acknowledgments

We thank R.E. Hawkins for providing reagents, and M. Llorente for helpful discussion.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LAV. Performed the experiments: AMC DSM LS MC LK FJB. Analyzed the data: AMC DSM LS JB LK FJB BO LAV. Contributed reagents/materials/analysis tools: JB LK LAV. Wrote the paper: LAV.

## References

1. Yazaki PJ, Wu AM (2003) Construction and Characterization of Minibodies for Imaging and Therapy of Colorectal Carcinomas. In: Welschof M, Krauss J, eds. Recombinant Antibodies for Cancer Therapy. Ed. Totowa: Humana Press. pp 351–364.
2. Holliger P, Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23: 1126–1136.
3. Williams LE, Wu AM, Yazaki PJ, Liu A, Raubitschek AA, et al. (2001) Numerical selection of optimal tumor imaging agents with application to engineered antibodies. *Cancer Biother Radiopharm* 16: 25–35.
4. Holliger P, Prospero T, Winter G (1993) “Diabodies”: small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6444–6448.
5. Whitlow M, Bell BA, Feng S-L, Filpula D, Hardman KD, et al. (1993) An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng* 6: 989–995.
6. Hu S-z, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, et al. (1996) Minibody: A Novel Engineered Anti-Carcinoembryonic Antigen Antibody Fragment (Single-Chain Fv-CH3) Which Exhibits Rapid, High-Level Targeting of Xenografts. *Cancer Res* 56: 3055–3061.
7. Adams GP, Schier R, McCall AM, Crawford RS, Wolf EJ, et al. (1998) Prolonged in vivo tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. *Br J Cancer* 77: 1405–1412.

8. Ebbinghaus C, Ronca R, Kaspar M, Grabulovski D, Berndt A, et al. (2005) Engineered vascular-targeting antibody-interferon-gamma fusion protein for cancer therapy. *Int J Cancer* 116: 304–313.
9. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, et al. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605–1612.
10. Viti F, Tarli L, Giovannoni L, Zardi L, Neri D (1999) Increased Binding Affinity and Valence of Recombinant Antibody Fragments Lead to Improved Targeting of Tumoral Angiogenesis. *Cancer Res* 59: 347–352.
11. Wong JY, Chu DZ, Williams LE, Yamauchi DM, Ikke DN, et al. (2004) Pilot trial evaluating an 123I-labeled 80-kilodalton engineered anticarcinoma embryonic antigen antibody fragment (cT84.66 minibody) in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10: 5014–5021.
12. Wu AM, Chen W, Raubitschek A, Williams LE, Neumaier M, et al. (1996) Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. *Immunotechnology* 2: 21–36.
13. Pack P, Muller K, Zahn R, Pluckthun A (1995) Tetravalent miniantibodies with high avidity assembling in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 246: 28–34.
14. Pluckthun A, Pack P (1997) New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* 3: 83–105.
15. Sánchez-Arevalo Lobo VJ, Cuesta AM, Sanz L, Compte M, Garcia P, et al. (2006) Enhanced antiangiogenic therapy with antibody-collagen XVIII NC1 domain fusion proteins engineered to exploit matrix remodeling events. *Int J Cancer* 119: 455–462.
16. Chester KA, Mayer A, Bhatia J, Robson L, Spencer DI, et al. (2000) Recombinant anti-carcinoma embryonic antigen antibodies for targeting cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl: S8–12.
17. Sanz L, Alvarez-Vallina L (2003) The extracellular matrix: a new turn-of-the-screw for anti-angiogenic strategies. *Trends Mol Med* 9: 256–62.
18. Hawkins RE, Russell SJ, Winter G (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 226: 889–896.
19. Compte M, Blanco B, Serrano F, Cuesta AM, Sanz L, et al. (2007) Inhibition of tumor growth in vivo by in situ secretion of bispecific anti-CEA x anti-CD3 diabodies from lentivirally transduced human lymphocytes. *Cancer Gene Ther* 14: 380–388.
20. Sanz L, Kristensen P, Blanco B, Facticeau S, Russell SJ, et al. (2002) Single-chain antibody-based gene therapy: inhibition of tumor growth by in situ production of phage-derived human antibody fragments blocking functionally active sites of cell-associated matrices. *Gene Ther* 9: 1049–1053.
21. Sanz L, Kristensen P, Russell SJ, Ramirez Garcia JR, Alvarez-Vallina L (2001) Generation and characterization of recombinant human antibodies specific for native laminin epitopes: potential application in cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 50: 557–565.
22. Blanco B, Holliger P, Vile RG, Alvarez-Vallina L (2003) Induction of human T lymphocyte cytotoxicity and inhibition of tumor growth by tumor-specific diabody-based molecules secreted from gene-modified bystander cells. *J Immunol* 171: 1070–1077.
23. Fiser A, Sali A (2003) Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol* 374: 461–491.
24. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, et al. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235–242.
25. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.
26. Pieper U, Eswar N, Braberg H, Madhusudhan MS, Davis FP, et al. (2004) MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic Acids Res* 32: D217–222.
27. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, et al. (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26: 1701–1718.
28. Zhou H, Zhou Y (2002) Distance-scaled, finite ideal-gas reference state improves structure-derived potentials of mean force for structure selection and stability prediction. *Protein Sci* 11: 2714–2726.
29. Birchler M, Neri G, Tarli L, Halin C, Viti F, et al. (1999) Infrared photodetection for the in vivo localisation of phage-derived antibodies directed against angiogenic markers. *J Immunol Methods* 231: 239–248.
30. Sasaki T, Fukai N, Mann K, Gohring W, Olsen BR, et al. (1998) Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J* 17: 4249–4256.
31. Chester KA, Begent RH, Robson L, Keep P, Pedley RB, et al. (1994) Phage libraries for generation of clinically useful antibodies. *Lancet* 343: 455–456.
32. Fan CY, Huang CC, Chiu WC, Lai CC, Liou GG, et al. (2008) Production of multivalent protein binders using a self-trimerizing collagen-like peptide scaffold. *FASEB J* 22: 3795–3804.
33. Lawrence IJ, Kortt AA, Iliades P, Tulloch PA, Hudson PJ (1998) Orientation of antigen binding sites in dimeric and trimeric single chain Fv antibody fragments. *FEBS letters* 425: 479–484.
34. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, et al. (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879–5883.
35. Adams GP, McCartney JE, Wolf EJ, Eisenberg J, Tai MS, et al. (1995) Optimization of in vivo tumor targeting in SCID mice with divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv: effects of dose escalation and repeated i.v. administration. *Cancer Immunol Immunother* 40: 299–306.
36. Beresford GW, Pavlinkova G, Booth BJ, Batra SK, Colcher D (1999) Binding characteristics and tumor targeting of a covalently linked divalent CC49 single-chain antibody. *Int J Cancer* 81: 911–917.
37. Willuda J, Kubetzko S, Waibel R, Schubiger PA, Zangemeister-Wittke U, et al. (2001) Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185(HER-2) miniantibodies multimerized by self-associating peptides. *J Biol Chem* 276: 14385–14392.
38. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Wood JF, Hubert SL, et al. (1993) Microautoradiographic analysis of the normal organ distribution of radioiodinated single-chain Fv and other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 53: 3776–3783.
39. Sanz L, Garcia-Bermejo L, Blanco FJ, Kristensen P, Feijoo M, et al. (2003) A novel cell binding site in the coiled-coil domain of laminin involved in capillary morphogenesis. *EMBO J* 22: 1508–1517.
40. Sasaki T, Fassler R, Hohenester E (2004) Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol* 164: 959–963.
41. Huang BC, Davern S, Kennel SJ (2006) Mono and bivalent binding of a scFv and covalent diabody to murine laminin-1 using radioiodinated proteins and SPR measurements: effects on tissue retention in vivo. *J Immunol Methods* 313: 149–160.
42. Sanz L, Blanco B, Alvarez-Vallina L (2004) Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks. *Trends Immunol* 25: 85–91.